

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/055693 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/11**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00152

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE  
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE  
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE  
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE

**LIMMER, Stephan** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). **ROST, Sylvia** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). **HADWIGER, Philipp** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(74) **Anwalt: GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstrasse 49a, 91052 Erlangen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(72) **Erfinder; und**

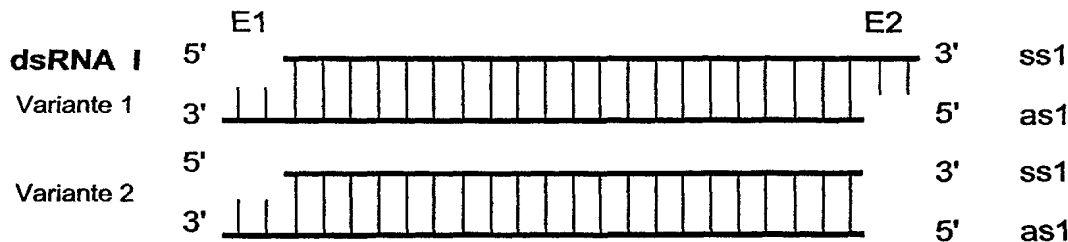
(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTZER, Roland** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINE ZIELGENS



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 - 4 nucleotides.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte: Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinn-Strang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA am einen Ende (E1) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

WO 02/055693 A2



**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens.

5

Aus der WO 99/32619 sowie der WO 00/44895 sind Verfahren zur Hemmung der Expression von medizinisch oder biotechnologisch interessanten Genen mit Hilfe einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) bekannt. Die bekannten Verfahren sind zwar  
10 hoch effektiv. Es besteht gleichwohl das Bedürfnis, deren Effizienz weiter zu steigern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere  
15 ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament angegeben werden, mit denen eine noch effizientere Hemmung der Expression eines Zielgens erreichbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 41 und  
20 81 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 40, 42 bis 80 und 82 bis 120.

Mit den erfindungsgemäß beanspruchten Merkmalen wird überraschenderweise eine drastische Erhöhung der Effektivität der  
25 Hemmung der Expression eines Zielgens in vitro und in vivo erreicht. Durch die besondere Ausbildung der Enden der dsRNA kann sowohl deren Effizienz bei der Vermittlung der hemmenden Wirkung auf die Expression eines Zielgens als auch deren Stabilität gezielt beeinflusst werden. Durch die Vergrößerung der  
30 Stabilität wird die wirksame Konzentration in der Zelle erhöht.

Unter einem "Zielgen" im Sinne der Erfindung wird der DNA-Strang der doppelsträngigen DNA in der Zelle verstanden, welcher  
35 komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Be-

reiche ist. Bei dem "Zielgen" handelt es sich also im allgemeinen um den Sinnstrang. Der eine Strang bzw. Antisinnstrang (as1) kann komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder deren Prozessierungsprodukt, z.B. eine mRNA, sein. Unter "Einführen" wird die Aufnahme in die Zelle verstanden. Die Aufnahme kann durch die Zelle selbst erfolgen; sie kann auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Unter einem "Überhang" wird ein endständiger einzelsträngiger Überstand verstanden, welcher nicht nach Watson & Crick gepaarte Nukleotide aufweist. Unter einer "doppelsträngigen Struktur" wird eine Struktur verstanden, bei der die Nukleotide der Einzelstränge im Wesentlichen nach Watson & Crick gepaart sind. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann eine doppelsträngige Struktur auch einzelne Fehlpaarungen ("Mismatches") aufweisen.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs bzw. Antisinnstrangs as1 und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs bzw. Sinnstrang ss1 auf. Die dsRNA I kann auch an einem Ende glatt ausgebildet sein. In diesem Fall befindet sich das glatte Ende vorteilhafterweise auf der Seite der dsRNA I, die das 5'-Ende des einen Strangs (Antisinnstrang; as1). In dieser Ausbildung zeigt die dsRNA I einerseits eine sehr gute Effektivität und andererseits eine hohe Stabilität im lebenden Organismus. Die Effektivität insgesamt in vivo ist hervorragend. Der Überhang ist zweckmäßigerweise aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise aus 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal kann die Effektivität des Verfahrens weiter erhöht werden, wenn zumindest eine entsprechend der erfindungsgemäßen dsRNA I ausgebildete weitere dsRNA II in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs der doppelsträngigen Struktur der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist, und wobei

ein weiterer Strang oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs der doppelsträngigen Struktur der weiteren dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist. Die Hemmung der Expression des Zielgens ist in diesem Fall deutlich gesteigert. Der erste und der zweite Bereich können abschnittsweise überlappen, aneinander grenzen oder auch voneinander beabstandet sein.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, wenn die dsRNA I und/oder die weitere dsRNA II eine Länge von weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweisen. Als besonders effektiv hat sich eine Länge im Bereich zwischen 19 und 23 Nukleotidpaaren erwiesen. Die Effizienz kann weiter gesteigert werden, wenn an den vorzugsweise aus 19 bis 23 Nukleotidpaaren gebildeten Doppelsträngen einzelsträngige Überhänge von 1 bis 4 Nukleotiden vorhanden sind.

Das Zielgen kann nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal eine der in dem anhängenden Sequenzprotokoll wiedergegebenen Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweisen. Es kann auch aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene zur Expression von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierende Molekülen sowie Gene zur Expression des EGF-Rezeptors. Beim Zielgen kann es sich insbesondere um das MDR1-Gen handeln. Es kann in diesem Zusammenhang eine der Sequenzen SQ141 - 173 bestehende bzw. ein aus jeweils zusammengehörenden Antisinn (as)- und Sinnsequenzen (ss) kombinierte dsRNA I/II verwendet werden.

Nach einem weiteren vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal wird die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt.

Das Zielgen wird zweckmäßigerweise in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert. Es kann Bestandteil eines Virus oder Viroids, insbesondere eines humanpathogenen Virus oder Viroids, sein. Das Virus oder Viroid kann auch ein  
5 tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist vorgesehen, dass die ungepaarten Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

10

Zumindest ein Ende der dsRNA I/II kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Vorteilhafterweise wird dazu der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt  
15 der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-  
20 Ionenkoordination gebildet werden. Es hat sich weiter als zweckmäßig und die Stabilität erhöhend erwiesen, wenn die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes gebildet ist. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen hinsichtlich der chemischen Verknüpfung können den Merkmalen der Ansprüche 24  
25 bis 30 entnommen werden, ohne dass es dafür einer näheren Erläuterung bedarf.

Die dsRNA I/II kann dann besonders einfach in die Zelle eingeschleust werden, wenn sie in micellare Strukturen, vorteil-  
30 hafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird. Zum Transport der dsRNA I/II in die Zelle hat es sich auch als vorteilhaft erwiesen, dass diese an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon um-  
35 geben werden. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Das Hüllprotein kann insbesondere das Virus-Protein

1 und/oder das Virus-Protein 2 des Polyomavirus enthalten. Nach einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist. Ferner ist es von Vorteil, dass der eine Strang der dsRNA I/II (as1/2) zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist. Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Weiterhin hat es sich gezeigt, dass die dsRNA I/II vorteilhafterweise bereits in einer Menge von höchstens 5 mg/kg Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht werden kann. Bereits in dieser geringen Dosis wird eine ausgezeichnete Effektivität erzielt.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen und dann oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht werden kann.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (Antisinnstrang; as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausrei-

chenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der dsRNA I/II wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen und Ausführungsbeispiele beispielhaft erläutert. Es zeigen:

- 15 Fig. 1a, b        schematisch eine erste und zweite doppelsträngige RNA und
- Fig. 2            schematisch ein Zielgen,
- 20 Fig. 3            relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (erstes Experiment),
- Fig. 4            relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (zweites Experiment),
- 25 Fig. 5            relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (drittes Experiment),
- 30 Fig. 6            relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (viertes Experiment),



Fig. 7 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in HeLa-S3-Zellen (fünftes Experiment),

5 Fig. 8 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,

10 Fig. 9 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-S3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw. nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,

15 Fig. 10 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in Maus-Serum,

Fig. 11 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in humanem Serum,

20 Fig. 12 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach Inkubation in Maus-Serum,

Fig. 13 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach  
25 Inkubation in humanem Serum,

Fig. 14 gelelektrophoretische Auftrennung von K3 nach Inkubation in Maus-Serum,

30 Fig. 15 gelelektrophoretische Auftrennung von PKC1/2 nach Inkubation in Maus-Serum,

Fig. 16 gelelektrophoretische Auftrennung von S1A/S4B nach Inkubation in humanem Serum,

35

- Fig. 17 gelelektrophoretische Auftrennung von K2 nach Inkubation in humanem Serum und
- Fig. 18 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an  
5 Nieren-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 19 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Herz-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- 10 Fig. 20 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Pankreas-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 21 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im  
15 Plasma,
- Fig. 22 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression in der Niere,
- 20 Fig. 23 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Herz,
- Fgi. 24 Western-Blot-Analyse der EGFR-Expression in U-  
25 87 MG Glioblastom-Zellen,
- Fig. 25a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 74 Stunden geerntet wurden,
- 30 Fig. 25b Quantifizierung der Banden nach Fig. 25a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,
- Fig. 26a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in  
35 der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 48 Stunden geerntet wurden,

Fig. 26b            Quantifizierung der Banden nach Fig. 26a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,

5

Fig. 27            vergleichende Darstellung einer durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer Transfektion mit 175 nM dsRNA (Sequenz R1 in Tabelle 4).

10

Die in den Fig. 1a und 1b schematisch gezeigten doppelsträngigen Ribonukleinsäuren dsRNA I und dsRNA II weisen jeweils ein erstes Ende E1 und ein zweites Ende E2 auf. Die erste und die zweite Ribonukleinsäure dsRNA I/dsRNAII weisen an ihren beiden Enden E1 und E2 einzelsträngige, aus etwa 1 bis 4 ungepaarten Nukleotiden gebildete Abschnitte auf. Es sind zwei mögliche Varianten dargestellt (Variante 1 und 2), wobei Variante 2 ein glattes Ende (E2) aufweist. Das glatte Ende kann jedoch auch in einer weiteren Variante am anderen Ende (E1) liegen.

20

In Fig. 2 ist schematisch ein auf einer DNA befindliches Zielgen gezeigt. Das Zielgen ist durch einen schwarzen Balken kenntlich gemacht. Es weist einen ersten Bereich B1 und einen zweiten Bereich B2 auf.

25

Jeweils der eine Strang der ersten dsRNA I (as1) bzw. der zweiten dsRNA II (as2) ist komplementär zum entsprechenden Bereich B1 bzw. B2 auf dem Zielgen.

30

Die Expression des Zielgens wird dann besonders wirkungsvoll gehemmt, wenn die dsRNA I/dsRNA II an ihren Enden E1, E2 einzelsträngige Abschnitte aufweist. Die einzelsträngigen Abschnitte können sowohl am Strang as1 oder as2 als auch am Gegenstrang (ss1 bzw. ss2) oder am Strang as1, as2 und am Gegenstrang ausgebildet sein.

35

Die Bereiche B1 und B2 können, wie in Fig. 2 gezeigt, von einander beabstandet sein. Sie können aber auch aneinander grenzen oder überlappen.

5

#### I. Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten:

Es wurden aus Sequenzen des Yellow Fluorescent Proteine (YFP), einer Variante des GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) der Alge *Aequoria victoria* abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) hergestellt und zusammen mit einem YFP-kodierenden Plasmid in Fibroblasten mikroinjiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme gegenüber Zellen ohne dsRNA ausgewertet.

#### Versuchsprotokoll:

Mittels eines RNA-Synthesizer (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen SQ148, 149 und SQ159 ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mit Hilfe der HPLC. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur. Die so erhaltenen dsRNAs wurden in die Testzellen mikroinjiziert.

Als Testsystem für diese Zellkultur-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, ECACC No. 93061524 (European Collection of Animal Cell Culture). Für die Mikroinjektionen wurde das Plasmid pcDNA-YFP verwendet, das ein 800bp großes Bam HI/Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vectors pcDNA3 enthält. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mit-transfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Die Auswer-

tung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte frühestens 3 Stunden nach Injektion anhand der grünen Fluoreszenz.

#### Vorbereitung der Zellkulturen:

5 Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom) im Brutschrank unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C. Die Zellen wurden alle 3 Tage passagiert, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Einen Tag vor der Durchführung der  
10 Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/TEDTA, Biochrom) und mit einer Zelldichte von  $0,3 \times 10^5$  Zellen in beschichteten Petrischalen (CORNING® Cell Culture Dish, 35 mm, Corning Inc., Corning, USA) ausgesät. Die Petrischalen wurden mit 0,2 % Gelatine (Biochrom) für mindestens  
15 30 Minuten bei 37°C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und sofort für die Aussaat der Zellen verwendet. Um ein Wiederfinden individueller Zellen zu ermöglichen, wurden CELLocate Coverslips der Fa. Eppendorf (Square size 55 µm) verwendet.

20

#### Mikroinjektion:

Zur Durchführung der Mikroinjektion wurden die Petrischalen ca. 10 Minuten aus dem Brutschrank genommen. Pro Schale und Ansatz wurden ca. 50 Zellen mikroinjiziert (FemtoJet; Mikro-  
25 manipulator 5171, Eppendorf). Für die Mikroinjektion wurden Glaskapillaren (FemtoTip) der Firma Eppendorf mit einem Spitzeninnendurchmesser von 0,5 µm verwendet. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden und der Druck 30 hPa. Durchgeführt wurden die Mikroinjektionen an einem Olympus IX50 Mikroskop mit  
30 Fluoreszenzeinrichtung. Als Injektionspuffer wurde 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0 verwendet, der 0,01 µg/µl pcDNA-YFP enthielt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Mikroinjektion wurde der Injektionslösung jeweils 0,08% (w/v) an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zugesetzt. Um die Inhibition der YFP-  
35 Expression mit spezifischer dsRNA zu untersuchen, wurden der

Injektionslösung dsRNAs zugegeben: Ansatz 1: 0,1  $\mu$ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/149); Ansatz 2: 0,1  $\mu$ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/159); Ansatz 3: ohne RNA. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen für mindestens drei weitere  
5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die intrazelluläre YFP-Fluoreszenz am Mikroskop ausgewertet:  
gleichzeitig rot und grün-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, es wird keine Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA beobachtet; bzw. es handelt sich um  
10 Kontrollzellen, in die keine dsRNA injiziert wurde;  
nur rot-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, die dsRNA inhibiert YFP-Expression.

#### Ergebnisse:

15 Bei einer dsRNA-Konzentration von 0,1  $\mu$ M konnte beim Einsatz der dsRNA mit den an beiden 3'-Enden um je zwei Nukleotide überstehenden Einzelstrangbereichen (Sequenzprotokoll SQ148/159) eine merklich erhöhte Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten beobachtet werden im Vergleich zur  
20 dsRNA ohne überstehende Einzelstrangenden (Tabelle 1).

Die Verwendung von kurzen, 19-25 Basenpaare enthaltenden, dsRNA-Molekülen mit Überhängen aus wenigen, vorzugsweise 1 bis 3 nicht-basengepaarten, einzelsträngigen Nukleotiden ermöglicht somit eine vergleichsweise stärkere Hemmung der  
25 Genexpression in Säugerzellen als die Verwendung von dsRNAs mit derselben Anzahl von Basenpaaren ohne die entsprechenden Einzelstrangüberhänge bei jeweils gleichen RNA-Konzentrationen.

Ansatz	Name	Sequenzprotokoll-Nr.	0.1 $\mu$ M
1	<b>S1A/</b> <b>S1B</b>	SQ148 SQ149	+
2	<b>S1A/</b> <b>S4B</b>	SQ148 (überstehende Enden) SQ159	+++
3		ohne RNA	-

**Tabelle 1:** Die Symbole geben den relativen Anteil an nicht oder schwach grün-fluoreszierenden Zellen an (+++ > 90%; ++ 60-90%; + 30-60%; - < 10%).

5

## II. Hemmung der Genexpression eines Zielgens in kultivierten HELA-S3-Zellen und Mausfibroblasten durch dsRNA:

- 10 Die Effektivität der Inhibition der YFP-Expression nach transien-  
sienter Transfektion eines YFP-codierenden Plasmids auf der  
Basis der RNA-Interferenz mit dsRNAs läßt sich durch Gestal-  
tung der 3'-Enden und der Länge des basengepaarten Bereichs  
modulieren.

15

### Ausführungsbeispiel:

- Zum Wirksamkeitsnachweis der dsRNA bei der spezifischen Inhi-  
bition der Genexpression wurden transient transfizierte  
20 NIH/3T3-Zellen (Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo, ECCAC  
(European collection of animal cell culture) Nr. 93061524)  
und HELA-S3 (humane cervikale Karzinomzellen, DSMZ (Deutsche  
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Nr. ACC 161)  
verwendet. Für die Transfektion wurde das Plasmid pcDNA-YFP  
25 verwendet, das ein 800 bp großes Bam HI /Eco RI-YFP-Fragment  
in den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pcDNA3 ent-  
hält. Aus der Sequenz des gelb-fluoreszierenden Proteins  
(YFP) abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) wurden herge-

stellt und zusammen mit dem Plasmid pcDNA-YFP transient in die Fibroblasten transfiziert (Die verwendeten spezifischen dsRNAs sind in ihren Antisinn-Strängen komplementär zu entsprechenden Abschnitten der Gensequenzen von sowohl YFP als auch GFP). Nach 48 Stunden wurde die Fluoreszenzabnahme quantifiziert. Als Kontrollen fungierten Zellen, die entweder nur mit pcDNA-YFP oder mit pcDNA-YFP und einer Kontroll-dsRNA (nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet) transfiziert wurden.

10 Versuchsprotokoll:

dsRNA-Synthese:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/ Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Aussaat der Zellen:

30 Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der NIH/3T3-Zellen und der HELA-S3 erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter



Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco`s modified eagle medium, Biochrom), für die Mausfibroblasten, und Ham`s F12 für die HELA-Zellen mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100  $\mu\text{g/ml}$ , Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA, Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Platte (Multiwell Schalen 96-Well Flachboden, Labor Schubert & Weiss GmbH) in  $150 \mu\text{l}$  Wachstumsmedium ausgesät.

#### Durchführung der transienten Transfektion:

Die Transfektion wurde mit Lipofectamine Plus<sup>TM</sup> Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden  $0,15 \mu\text{g}$  pcDNA-YFP-Plasmid eingesetzt. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug  $60 \mu\text{l}$ . Es wurden jeweils 3-fach-Proben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zuerst zusammen mit der dsRNA komplexiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA und die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt und pro  $0,1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA  $1 \mu\text{l}$  PLUS Reagent eingesetzt (in einem Volumen von  $10 \mu\text{l}$ ) und nach dem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde pro  $0,1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA  $0,5 \mu\text{l}$  Lipofectamine in insgesamt  $10 \mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt, gut gemischt, zu dem Plasmid/dsRNA/PLUS-Gemisch zugegeben und nochmals 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit  $200 \mu\text{l}$  serumfreiem Medium gewaschen und danach mit  $40 \mu\text{l}$  serumfreiem Medium bis zur Zugabe von DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine pro

Well wurden die Zellen für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Inkubation 1 x mit 200 µl Wachstumsmedium gewaschen und für 24 Stunden bis zur Detektion der Fluoreszenz in 200 µl Wachstumsmedium im Brutschrank inkubiert.

#### Detektion der Fluoreszenz:

24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (IX50-S8F2, Fluoreszenz-Einheit U-ULS100Hg, Brenner U-RFL-T200, Olympus) mit einer USH-I02D-Quecksilber-Lampe (USHIO Inc., Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem WIB-Fluoreszenz-Würfel und einer digitalen CCD-Kamera (Orca IIm, Hamamatsu) und C4742-95 Kamera-Controller) photographiert. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der analysis-Software 3.1 (Soft Imaging Sytem GmbH, Deutschland). Um die YFP-Fluoreszenz in Relation zur Zelldichte zu setzen, wurde eine Zellkernfärbung (Hoechst-Staining) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Methylcarnoy (75% Methanol, 25% Eisessig) zuerst für 5 und danach nochmals für 10 Minuten in Methylcarnoy fixiert. Nach dem Lufttrocknen wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit 100 µl pro Well Hoechst-Farbstoff (75 ng/ml) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS (PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrom) wurden die Hoechst-gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, WU-Fluoreszenz-Würfel für Hoechst) photographiert.

In den Fig. 3 bis 9 sind die Ergebnisse zur Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA in kultivierten Zellen zusammengefasst:

In Fig. 3, 4, 5 und 6 sind die Effekte von YFP-spezifischen dsRNAs und von Kontroll-dsRNAs auf die YFP-Expression in NIH/3T3-Mausfibroblasten nach transienter Transfektion zusammengefasst. Die Experimente wurden wie im Versuchsprotokoll

beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der dsRNA bezieht sich auf die Konzentration im Medium während der Transfektionsreaktion. Die Bezeichnungen für die dsRNAs sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz pro Bildausschnitt in Flächenprozent. Pro Well wurden 3 verschiedene Bildausschnitte ausgewertet. Die Mittelwerte ergeben sich aus den 3-fach-Ansätzen.

In den Fig. 7 und 9 ist die spezifische Inhibition der YFP-Genexpression durch dsRNAs in HELA-S3-Zellen dargestellt.

In Fig. 7 ist die hemmende Wirkung unterschiedlich gestalteter dsRNA-Konstrukte (Tabelle 2) in verschiedenen Konzentrationen auf die Expression von YFP in HeLa-Zellen dargestellt. Fig. 8 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten NIH/3T3-Maus-

fibroblasten ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

8A: YFP-Kontrolle

8B: S1, 10 nM

8C: S4, 10 nM

8D: S7, 10 nM

8E: S7/S11, 1 nM

8F: S7/S12, 1 nM

Fig. 9 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten HELA-3S-Zellen ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

9A: K2-Kontrolle, 10 nM

9B: S1, 10 nM

9C: S4, 10 nM

9D: S7, 10 nM

9E: S7/11, 1 nM

9F: S7/12, 1 nM

9G: S1A/S4B, 10 nM

9H: YFP-Kontrolle

Ergebnisse:

- 5 Fig. 3 zeigt, dass die YFP-Expression nach transienter  
Kotransfektion von Mausfibroblasten mit dem YFP-Plasmid und  
spezifisch gegen die YFP-Sequenz gerichteten dsRNAs dann be-  
sonders wirkungsvoll gehemmt wird, wenn die 3'-Enden der 22  
und 19 Basenpaare enthaltenden Bereiche der dsRNAs einzel-  
10 strängige Abschnitte von 2 Nukleotiden (nt) aufweisen. Wäh-  
rend die dsRNA S1 mit glatten 3'-Enden bei einer Konzentrati-  
on von 1 nM (bezogen auf die Konzentration im Zellkultur-  
Medium während der Durchführung der Transfektion) keine inhi-  
bitorischen Effekte auf die YFP-Expression zeigt, inhibieren  
15 die dsRNAs S7 (19 Nukleotidpaare) und S4 (22 Nukleotidpaare)  
mit jeweils 2nt Überhängen an beiden 3'-Enden die YFP-  
Expression um 50 bzw. um 70% im Vergleich zu den entsprechen-  
den Kontroll-dsRNAs K3 und K2. Bei einer Konzentration von 10  
nM inhibiert die als S1 bezeichnete dsRNA mit glatten Enden  
20 die YFP-Expression um ~65%, während die Inhibition der YFP-  
Expression durch die S4 dsRNA ~93% beträgt (Fig. 4). Der in-  
hibitorische Effekt der mit S4 und S7 bezeichneten dsRNAs ist  
konzentrationsabhängig (Fig. 3 und 4, siehe auch Fig. 7).
- 25 Fig. 4 zeigt, dass für die effiziente Unterdrückung der YFP-  
Genexpression die einzelsträngige Ausbildung nicht an beiden  
3'-Enden (auf Sinn- und Antisinn-Strang) notwendig ist. Um  
eine möglichst effektive Inhibition der YFP-Expression zu er-  
reichen, ist lediglich der 2nt-Überhang am 3'-Ende auf dem  
30 Antisinn-Strang notwendig. So liegt die Inhibition der YFP-  
Expression bei einer Konzentration von 1 nM bei den beiden  
dsRNAs S4 (mit 2nt-Überhängen auf beiden 3'-Enden) und  
S1A/S4B (mit einem 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des Antisinn-  
Stranges) bei ~70%. Befindet sich dagegen der 2nt-Überhang

auf dem 3'-Ende des Sinn-Stranges (und das 3'-Ende des Antisinn-Stranges trägt keinen einzelsträngigen Bereich), so liegt die Inhibition der YFP-Genexpression lediglich bei 50%. Analog ist die Inhibition bei höheren Konzentrationen deutlich besser, wenn mindestens das 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2nt-Überhang trägt.

Eine deutlichere Hemmung der YFP-Expression wird erreicht, wenn der basengepaarte Bereich 21 Nukleotid-Paare statt 22 (S1 und S4), 20 (S13 bzw. S13/14) oder 19 (S7) umfasst (Fig. 5, 6 und 7). So beträgt die Inhibition der YFP-Expression durch S1 (22 Basenpaarungen mit glatten Enden) in einer Konzentration von 5 nM ~40%, während die Inhibition durch S7/S12 (21 Basenpaarungen mit glatten Enden), ebenfalls mit 5 nM bei ~92% liegt. Weist die dsRNA mit 21 Basenpaarungen noch einen 2nt-Überhang am Antisinnstrang-3'-Ende (S7/S11) auf, so liegt die Inhibition bei ~ 97% (verglichen mit ~73% Inhibition durch S4 und ~70% Inhibition durch S7).

### III. Untersuchung der Serumstabilität der doppelsträngigen RNA (dsRNA):

Ziel ist es, die in den Zellkulturen gefundene Effektivität der durch dsRNAs vermittelten Hemmung der Genexpression von Zielgenen für den Einsatz *in vivo* zu steigern. Dies wird durch eine verbesserte Stabilität der dsRNAs im Serum und durch eine daraus resultierende verlängerte Verweilzeit des Moleküls im Kreislauf bzw. die damit verbundenen erhöhte-wirksame- Konzentration des funktionellen Moleküls erreicht.

### Ausführungsbeispiel:

Die Serumstabilität der die GFP-Expression hemmenden dsRNAs wurde ex vivo in murinem und humanem Serum getestet.

Versuchsprotokoll:

5

Die Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum mit der entsprechenden dsRNA erfolgte bei 37°C. Es wurden je 85 µl Serum mit 15 µl 100µM dsRNA inkubiert. Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) wurden die Proben  
10 bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurde dsRNA ohne Serum (+85 µl ddH<sub>2</sub>O) und dsRNA mit Serum zum Zeitpunkt 0 verwendet.

Für die Isolierung der dsRNA aus dem Inkubationsansatz, die auf Eis erfolgte, wurden jeweils 400 µl 0,1% SDS zu den Ansätzen gegeben und diese einer Phenolextraktion unterzogen:  
15 Pro Ansatz wurden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (IAA, 25:24:1, Roti<sup>®</sup>-Phenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 30 sec auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie-2; Scientific Industries). Nach 10minütiger Inkubation auf Eis  
20 erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C, für 10 min (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). Die obere wässrige Phase (ca. 200 µl) wurde abgenommen und zuerst einem DNase I- und danach einem Proteinase K - Verdau unterzogen: Zugabe von 20 µl 10xfach DNaseI-Puffer (100 mM Tris,  
25 pH 7,5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) und 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min Inkubation bei 37°C, erneute Zugabe von 6 U DNase I und Inkubation für weitere 20 min bei 37°C, Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peqlab, Deutschland) und 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde ei-  
30 ne Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde 500 µl Phenol : Chloroform : IAA (25:24:1) zugegeben, 30 sec auf höchster Stufe gevortext, 10 min bei 12.000xg, 4°C, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nacheinander mit 40 µl 3 M Na-Ac (Natriumacetat), pH 5,2, und 1 ml 100% EtOH versetzt, dazwi-

schen gut gemischt und für mindestens 1 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei  $12.000\times g$  für 30 min und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min,  $12.000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30  $\mu\text{l}$  RNA-Gelauftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 x TBE (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,02% (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und bis zum Gelauftrag bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

10 Zur Charakterisierung der dsRNA wurde eine analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (analytische PAGE) durchgeführt. Die Harnstoffgele wurden kurz vor dem Lauf hergestellt: 7M Harnstoff (21g) wurde in 25 ml 40% wässrige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese-Gel, A515.1, Roth) und 5 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA pro L Aqua dest.) unter Rühren gelöst und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Kurz vor dem Gießen wurden 50  $\mu\text{l}$  TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 500  $\mu\text{l}$  10% APS (Ammoniumperoxidisulfat) zugesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur (Merck, Darmstadt) eingesetzt und ein Vorlauf für 30 min bei konstant 40 mA Stromstärke durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die RNA-Proben für 5 min bei  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt, auf Eis abgekühlt und für 20 sec in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, minispin) abzentrifugiert. Es wurden je 15  $\mu\text{l}$  auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für ca. 2h bei einem konstanten Stromfluß von 40 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min bei RT (Raumtemperatur) mit Stains all-Färbelösung (20 ml Stains all Stammlösung (200 mg Stains all in 200 ml Formamid gelöst) mit 200 ml Aqua dest. und 180 ml Formamid versetzt) gefärbt und die Hintergrundfärbung danach durch Spülen in Aqua dest. für 45 min entfernt. Die Gele wurden mit dem Photodokumentationssystem Image Master VDS von Pharmacia photographiert.

Die Fig. 10 bis 17 zeigen die Serumstabilität der dsRNA nach Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum und nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung im 20%igem 7M Harnstoffgel.

5 **Fig. 10: Inkubation von S1 (0-22-0) in Maus-Serum**

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)

2. zum Zeitpunkt 0

3. für 30 Minuten

4. für 1 Stunde

10 5. für 2 Stunden

6. für 4 Stunden

7. für 12 Stunden

8. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M S1 ohne Inkubation

S1A) Sinnstrang S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1A)

15 S1B) Antisinnstrang S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1B)

**Fig. 11: Inkubation von S1 (0-22-0) in humanem Serum**

1. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M S1 unbehandelt (ohne Inkubation)

2. für 30 Minuten

3. für 2 Stunden

20 4. für 4 Stunden

5. für 6 Stunden

6. für 8 Stunden

7. für 12 Stunden

8. für 24 Stunden

25 S1A) Sinnstrang S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1A)

S1B) Antisinnstrang S1 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1B)

**Fig. 12: Inkubation von S7 (2-19-2) in Maus-Serum**

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)

2. für 30 Minuten

30 3. für 4 Stunden

4. für 12 Stunden

**Fig. 13: Inkubation von S7 (2-19-2) in humanem Serum**

1. Sinnstrang S7 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S7A)



2. Antisinnstrang S7 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S7B)
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
5. für 2 Stunden
- 5 6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 12 Stunden
9. für 24 Stunden
10. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)

10 **Fig. 14: Inkubation von K3 (2-19-2) in Maus-Serum**

1. Sinnstrang K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3A)
2. Antisinnstrang K3 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K3B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. zum Zeitpunkt 0 (mit Serum)
- 15 5. für 30 Minuten
6. für 1 Stunde
7. für 2 Stunden
8. für 4 Stunden
9. für 12 Stunden

20 **Fig. 15: Inkubation von PKC1/2 (0-22-2) in Maus-Serum**

1. für 30 Minuten
2. für 1 Stunde
3. für 2 Stunden
4. für 4 Stunden
- 25 5. für 12 Stunden
6. 2  $\mu$ l 100  $\mu$ M PKC1/2 (unbehandelt)

**Fig. 16: Inkubation von S1A/S4B (0-22-2) in humanem Serum**

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 24 Stunden
- 30 3. für 12 Stunden
4. für 8 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 4 Stunden

7. für 2 Stunden
8. für 30 Minuten
9. Sinnstrang S1A (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S1A)
10. Antisinnstrang S4B (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M S4B)

5 **Fig. 17: Inkubation von K2 (2-22-2) in humanem Serum**

1. Sinnstrang K2 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K2A)
2. Antisinnstrang K2 (10  $\mu$ l 20  $\mu$ M K2B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. für 30 Minuten
- 10 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 8 Stunden
9. für 12 Stunden
- 15 10. für 24 Stunden

Ergebnisse:

dsRNAs ohne einzelsträngige Bereiche an den 3'-Enden sind im  
20 Serum sowohl von Mensch und Maus wesentlich stabiler als  
dsRNAs mit einzelsträngigen 2nt-Überhängen an den 3'-Enden  
(Fig. 10 bis 14 und 17). Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation  
von S1 in murinem bzw. humanem Serum ist noch immer eine Ban-  
de in der ursprünglichen Größe fast vollständig erhalten. Da-  
25 gegen nimmt bei dsRNAs mit 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden  
die Stabilität in humanem als auch im murinen Serum deutlich  
ab. Bereits nach 4 Stunden Inkubation von S7 (Fig. 12 und 13)  
oder K3 (Fig. 14) ist keine Bande in der Originalgröße mehr  
detektierbar.

30

Um die Stabilität von dsRNA im Serum zu erhöhen, ist es aus-  
reichend, wenn die dsRNA ein glattes Ende besitzt. Im Maus-  
Serum ist nach 4 Stunden Inkubation (Fig. 15, Bahn 4) die

Bande in der Originalgröße kaum abgebaut im Vergleich zu S7 (nach 4 Stunden vollständiger Abbau; Fig. 12, Bahn 3).

Als optimaler Kompromiß hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit von dsRNA kann die Verwendung von dsRNA mit einem glattem Ende und einem einzelsträngigem Bereich von 2 Nukleotiden angesehen werden, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges befinden sollte.

10 Die hier verwendeten Sequenzen sind aus der nachstehenden Tabelle 2 und den Sequenzprotokollen SQ148-151 und 153-167 ersichtlich.

Name	Sequenz- proto- koll-Nr.	dsRNA-Sequenz	
S1	SQ148 SQ149	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-0
S7	SQ150 SQ151	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	2-19-2
K1	SQ153 SQ154	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-0
K3	SQ155 SQ156	(A) 5'- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3' (B) 3'- UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5'	2-19-2
K2	SQ157 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-2
S1A/ S4B	SQ148 SQ159	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-2

<b>PKC 1/2</b>	SQ160	(A)	5'- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3'	<b>2-22-0</b>
	SQ161	(B)	3'- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5'	
<b>S7/S12</b>	SQ150	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3'	<b>0-21-0</b>
	SQ162	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
<b>S7/S11</b>	SQ150	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3'	<b>0-21-2</b>
	SQ163	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
<b>S13</b>	SQ164	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACU -3'	<b>0-20-2</b>
	SQ165	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
<b>S13/14</b>	SQ164	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACU -3'	<b>0-20-0</b>
	SQ166	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
<b>S4</b>	SQ167	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3'	<b>2-22-2</b>
	SQ159	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	
<b>K1A/ K2B</b>	SQ153	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3'	<b>0-22-2</b>
	SQ158	(B)	3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
<b>K1B/ K2A</b>	SQ154	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3'	<b>2-22-0</b>
	SQ157	(B)	3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
<b>S1B/ S4A</b>	SQ149	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU -3'	<b>2-22-0</b>
	SQ167	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	

**Tabelle 2**IV. In vivo-Studie:

5

Es wurde „GFP-Labormäusen“, die das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-Sequenz abgeleitet wurde, bzw. unspezifische dsRNA intravenös

10 in die Schwanzvene injiziert. Am Versuchsende wurden die Tie-

re getötet und die GFP-Expression in Gewebeschnitten und im Plasma analysiert.

#### Versuchsprotokoll:

5

##### Synthese der dsRNA:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex, verwendet; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

##### Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung:

Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev. 76: 79-90; Hadjantonakis AK et al., 1998 Nature Genetics 19: 220-222). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den deutschen Tier-  
schutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Um-  
weltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makro-  
lon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten  
5 Temperatur von 22°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h  
gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15  
der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Lei-  
tungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Al-  
tromin) ad libitum.

10 Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-  
Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen wie oben be-  
schrieben gehalten. Die Injektionen der dsRNA-Lösung erfolg-  
ten intravenös (i.v.) in die Schwanzvene im 12h-Turnus (zwi-  
15 schen 5<sup>30</sup> und 7<sup>00</sup> sowie zwischen 17<sup>30</sup> und 19<sup>00</sup> Uhr) über 5 Tage  
hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Körperge-  
wicht und die Dosis betrug 2,5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg  
Körpergewicht. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt:

- 20 Gruppe A: PBS (phosphate buffered saline) je 60 µl pro  
10 g Körpergewicht,
- Gruppe B: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer unspezifi-  
schen Kontroll-dsRNA (K1-Kontrolle mit glatten  
25 Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nu-  
kleotidpaaren),
- Gruppe C: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer weiteren un-  
spezifischen Kontroll-dsRNA (K3-Kontrolle mit  
30 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden und einem  
Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren),
- Gruppe D: 2,5 mg pro kg Körpergewicht dsRNA (spezifisch  
gegen GFP gerichtet, im weiteren als S1 be-

zeichnet, mit glatten Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nukleotidpaaren),

Gruppe E: 2,5 mg dsRNA pro kg Körpergewicht (spezifisch gegen GFP gerichtet, im Weiteren als S7 bezeichnet, mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren)

Gruppe F: 50 µg S1-dsRNA pro kg Körpergewicht (also 1/50 der Dosis der Gruppe D).

Nach der letzten Injektion von insgesamt 10 Injektionen wurden die Tiere nach 14-20h getötet und Organe und Blut wie beschrieben entnommen.

#### Organentnahme:

Sofort nach dem Töten der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNAeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme 30 min auf Eis gehalten, gemixt, 5 min bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert (hier als Plasma bezeichnet).

#### Prozessieren der Biopsien:

Nach 24h Fixierung der Gewebe in MC wurden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT (Raumtemperatur) dehydriert: je 40 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe  
5 in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica) Gewebeschnitte von 3 µm Schnittdicke  
10 angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

#### Immunperoxidase-Färbung gegen GFP:

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden im Folgenden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde  
20 mit dem 1. Antikörper (goat anti-GFP, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (donkey anti-goat; Santa Cruz Biotechnology; 1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min  
25 mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen und Pufferreste mit Zellstoff von den Schnitten entfernt. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA)/PBS verdünnt. Die Färbung mit  
30 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit



Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte mit dem IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

5 Proteinisolierung aus Gewebestücken:

Zu den noch gefrorenen Gewebestücken wurden jeweils 800 µl Isolierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% Glycerol; 0,1% Tween; 1 mM DTT; 10 mM β-Glycerol-Phosphat; 1 mM NaF; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> mit einer Pro-  
10 tease-Inhibitor-Tablette „Complete“ von Roche) zugegeben und 2 x 30 Sekunden mit einem Ultraturrax (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Heidolph) homogenisiert, dazwischen auf Eis abgekühlt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde gemischt und für 20 Minuten bei 10.000xg, 4°C, zentrifugiert (3K30,  
15 Sigma). Der Überstand wurde erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert, gemischt und 20 Minuten bei 15.000xg, 4°C, zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford, 1976, modifiziert nach Zor & Selinger, 1996, mit dem Roti-Nanoquant-System von Roth nach den Angaben des Her-  
20 stellers durchgeführt. Für die Protein-Eichgerade wurde BSA (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese:

25 Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke  
30 gegossen: 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,4, 150 µl 10% SDS, 3,3 ml Aqua bidest., 250 µl Ammoniumpersulfat (10%), 9 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1%

SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83  $\mu$ l Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630  $\mu$ l 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat, 5  $\mu$ l TEMED.

5

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit einer entsprechenden Menge an 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurde die gleichen Plasma- bzw. Proteinmengen eingesetzt (je 3  $\mu$ l Plasma bzw. 25  $\mu$ g Gesamtprotein). Die Elektrophorese erfolgte wasergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker von Bio-Rad (Kaleidoscope Prestained Standard) verwendet.

#### Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat anti-GFP, sc-5384, San-

ta Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:1000 erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Horseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1 : 10.000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.

In den Fig. 18 bis 20 ist die Inhibition der GFP-Expression nach intravenöser Injektion von spezifisch gegen GFP gerichteter dsRNA mit Immunperoxidase-Färbungen gegen GFP an 3  $\mu$ m Paraffinschnitten dargestellt. Im Versuchsverlauf wurde gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem doppelsträngigen Bereich von 22 Nukleotid-(nt)paaren ohne Überhänge an den 3'-Enden (D) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (B) sowie spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (E) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (C) im 12 Stunden-Turnus über 5 Tage hinweg appliziert. (F) erhielt 1/50 der Dosis von Gruppe D. Als weitere Kontrolle wurden Tiere ohne dsRNA-Gabe (A) bzw. WT-Tiere untersucht. Die Fig. 18 zeigt die Inhibition der GFP-Expression in Nierenschnitten, Fig. 19 in Herz- und Fig. 20 in Pankreasgewebe. In den Fig. 21 bis 23 sind Western Blot-Analysen der GFP-Expression in Plasma und Geweben dargestellt. In der Fig. 21 ist die Inhibition der GFP-Expression im Plasma, in Fig. 22 in der Niere und in Fig. 23 in Herz gezeigt. In Fig. 23 sind Gesamtproteinisolate aus verschiedenen Tieren aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen pro Bahn aufgetragen. In den Tieren, denen unspezifische Kontroll-dsRNA verabreicht wurde (Tiere der Gruppen B und C), ist die GFP-Expression gegenüber Tieren, die keinerlei dsRNA erhielten, nicht reduziert. Tiere, die spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden

beider Stränge und einen 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich erhielten, zeigten eine signifikant inhibierte GFP-Expression in den untersuchten Geweben (Herz, Niere, Pankreas und Blut), verglichen mit unbehandelten Tieren (Fig. 18 bis 23). Bei den Tieren der Gruppen D und F, denen spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit glatten Enden und einem 22 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich appliziert wurde, zeigten nur jene Tiere, die die dsRNA in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht pro Tag erhielten, eine spezifische Inhibition der GFP-Expression, die allerdings weniger deutlich ausgeprägt war als die der Tiere in Gruppe E.

Die zusammenfassende Auswertung von GFP-Inhibition in den Gewebeschnitten und im Western Blot ergibt, dass die Inhibition der GFP-Expression im Blut und in der Niere am stärksten ist (Fig. 18, 21 und 22).

V. Hemmung der Genexpression des EGF-Rezeptors mit dsRNA als therapeutischer Ansatz bei Krebsformen mit EGFR-Überexpression oder EGFR-induzierter Proliferation:

Der Epidermal Growth Factor (=EGF)-Rezeptor (=EGFR) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen, transmembranen Proteinen mit einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität, die an der Kontrolle einer Reihe von zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierungen, migratorischen Prozessen oder der Zellvitalität beteiligt sind (Übersicht in: Van der Geer et al. 1994). Die Familie der EGFR besteht aus 4 Mitgliedern, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) mit einer transmembranen Domäne, einer cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Die Sequenz des EGFR, einem 170 kDa Protein, ist seit 1984 bekannt (Ullrich et al., 1984).

Aktiviert wird der EGFR durch Peptid-Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF $\alpha$  (transforming growth factor), Amphiregulin, Beta-cellulin, HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) und Neureguline. Ligandenbindung induziert die Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit nachfolgender Autophosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosine (Ullrich & Schlessinger, 1990; Alroy & Yarden, 1997). Die phosphorylierten Aminosäuren bilden die Bindungsstellen für eine Vielzahl von Proteinen, die an den proximalen Schritten der Signalweiterleitung in einem komplexen Netzwerk beteiligt sind. Der EGFR ist an den verschiedensten Tumorerkrankungen beteiligt und damit ein geeignetes Target für therapeutische Ansätze (Huang & Harari, 1999). Die Mechanismen, die zu einer aberranten EGFR-Aktivierung führen, können auf Überexpression, Amplifikation, konstitutiver Aktivierung mutanter Rezeptor-Formen oder autokrinen Loops beruhen (Voldborg et al., 1997). Eine Überexpression des EGFR wurde für eine Reihe von Tumoren beschrieben, wie z.B. Brustkrebs (Walker & Dearing, 1999), Nicht-Klein-Lungenkarzinom (Fontanini et al., 1998), Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom (Salomon et al., 1995) und Glioblastomen (Rieske et al., 1998). Insbesondere für maligne Glioblastome sind bisher keine effizienten und spezifischen Therapeutika verfügbar.

#### Ausführungsbeispiel:

Zum Nachweis der Wirksamkeit der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der EGFR-Genexpression wurden U-87 MG-Zellen (humane Glioblastomzellen), ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 89081402, verwendet, die mit spezifisch gegen den EGF-Rezeptor (Sequenzprotokoll SQ 51) gerichteten dsRNA transfiziert wurden. Nach ca. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, Protein isoliert und im Western Blot Verfahren die EGFR-Expression untersucht.

Versuchsprotokoll:dsRNA-Synthese:

- 5 Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute.
- 10
- 15 Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

20

Aussaat der Zellen:

- Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der U-87 MG-Zellen erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom) mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom), 1xNEAA (Non-essential Aminoacids, Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Applikation der dsRNA mittels Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA,
- 25
- 30

Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in einer 6-Well-Platte (6-Well Schalen, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 1,5 ml Wachstumsmedium ausgesetzt.

5

Applikation der dsRNA in kultivierte U-87 MG-Zellen:

Die Applikation der dsRNA erfolgte mittels Transfektion mit dem OLIGOFECTAMINE™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug  
10 1 ml. Zuerst wurde die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt: Dazu wurden pro Well 0,5 µl einer 20 µM Stammlösung spezifisch gegen EGFR gerichteten dsRNA und 9,5 µl einer 20 µM Stammlösung unspezifischer dsRNA (K1A/K2B) mit 175 µl serumfreiem Medium verdünnt (200 nM dsRNA im Transfektionsansatz  
15 bzw. 10 nM spezifische EGFR-dsRNA). Das OLIGOFECTAMINE™ Reagent wurde ebenfalls in serumfreiem Medium verdünnt: pro Well 3 µl mit 12 µl Medium und danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das verdünnte OLIGOFECTAMINE™ Reagent zu den in Medium verdünnten dsRNAs gegeben, gemischt und für  
20 weitere 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 1 ml serumfreiem Medium gewaschen und mit 800 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl  
25 dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent pro Well wurden die Zellen bis zur Proteinisolierung weiter im Brutschrank inkubiert.

Proteinisolierung:

Ca. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und eine Proteinisolierung durchgeführt. Dazu wurde das  
30 Medium abgenommen und das Zellmonolayer 1 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Proteinisolierungspuffer (1x Protease-Inhibitor „Complete“, Roche, 50 mM HEPES, pH 7,5,

150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10% Glyzerin, 0,1% Tween-20, 1 mM DTT, 10 mM  $\beta$ -Glycerinphosphat, 1 mM NaF, 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, 10 min auf Eis inkubiert, in ein Eppendorf-

5 Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80^\circ\text{C}$  für mindestens 30 min gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat für 10 sec mit einem Dispergierer (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Heidolph-Instruments GmbH & Co KG, Schwabach) auf Stufe 3 homogenisiert, für 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei  
10 14.000xg,  $4^\circ\text{C}$  (3K30, Sigma) zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Roti®-Nanoquant-System von Roth (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden je 200  $\mu\text{l}$  Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 800  $\mu\text{l}$  1x Arbeits-  
15 lösung gemischt und die Extinktion in Halbmikroküvetten bei 450 und 590 nm gegen Aqua dest. in einem Beckman-Spektralphotometer (DU 250) gemessen. Für die Eichgerade wurden entsprechende BSA-Verdünnungen verwendet (perliertes BSA, Sigma).

20

#### SDS-Gelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 7,5% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke gegossen: 3,75 ml Acrylamid/Bisaacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,4, 150  $\mu\text{l}$  10% SDS, 7,15 ml Aqua bi-dest., 150  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (10%), 9  $\mu\text{l}$  TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630  $\mu\text{l}$  1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50  $\mu\text{l}$  10% SDS, 50  $\mu\text{l}$  10% Ammoniumpersulfat, 5  $\mu\text{l}$  TEMED.



Für den Auftrag auf das Gel wurden die Proteinproben 1:3 mit 4x Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurden 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Gelauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längensstandard wurde der Kaleidoskop-Proteingelmarker (BioRad) verwendet.

#### Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h. Als Transferpuffer wurden verwendet: Kathodenpuffer (30 mM Tris, 40 mM Glycin, 10% Methanol, 0,01% SDS; pH 9,4), Anodenpuffer I (300 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol) und Anodenpuffer II (30 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol). Vor dem Zusammensetzen des Blotstapels mit 3MM Whatman-Papier (Schleicher & Schüll) wurden das Gel in Kathodenpuffer und die PVDF-Membran (zuvor 30 sec in 100% Methanol) in Anodenpuffer II inkubiert (5 min): 2 Lagen 3MM-Papier (Anodenpuffer I), 1 Lage 3MM-Papier (Anodenpuffer II), PVDF-Membran, Gel, 3 Lagen 3MM-Papier (Kathodenpuffer). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig).

Die Blotmembran wurde nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS/0,1% Tween-20 für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nach-

folgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (human EGFR extracellular domain, specific goat IgG, Cat-Nr. AF231, R&D Systems) erfolgte auf einem Schüttler für 2h bei RT in einer Konzentration von 1,5 µg/ml. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Horseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert (1:10.000 verdünnt). Nach dem Waschen (3 x 3min in PBS/0,1% Tween-20) erfolgte sofort die Detektion mittels ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence): Zu 18 ml Aqua dest. wurden 200 µl Lösung A (250 mM Luminol, Roth, gelöst in DMSO), 89 µl Lösung B (90 mM p-Coumarsäure, Sigma, gelöst in DMSO) und 2 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung pipettiert. Je nach Membrangröße wurden 4-6 ml direkt auf die Membran pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und danach sofort ein Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) aufgelegt.

Die hier verwendeten Sequenzen sind in der nachstehenden Tabelle 3 sowie in den Sequenzprotokollen SQ153, 157, 158, 168-173 wiedergegeben.

<b>ES-7</b>	SQ168 SQ169	(A) 5'- AACACCGCAGCAUGUCAAGAU -3' (B) 3'- UUUUGUGGCGUCGUACAGUUC -5'	<b>2-19-2</b>
<b>ES-8</b>	SQ170 SQ171	(A) 5'- AAGUUAAAAUCCCGUCGCUAU -3' (B) 3'- CAAUUUUAAGGGCAGCGAUAGU -5'	<b>2<sup>5</sup>-19-2<sup>5</sup></b>
<b>ES2A/ ES5B</b>	SQ172 SQ173	(A) 5'- AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAA -3' (B) 3'- UUUCACACUAGGUUCGACAGGGUU -5'	<b>0-22-2</b>
<b>K2</b>	SQ157 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	<b>2-22-2</b>

<b>K1A/ K2B</b>	SQ153 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-2
---------------------	----------------	--	--------

Tabelle 3

Inhibition der EGFR-Expression in U-87 MG Glioblastom-Zellen:

5 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit 10 nM dsRNA wie angegeben (Oligofectamine) transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und Protein isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 7,5% SDS-PAGE. Pro Bahn wurden je 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. In Fig. 24 ist die

10 entsprechende Western Blot-Analyse gezeigt, aus der hervorgeht, dass sich mit der spezifisch gegen das EGFR-Gen gerichteten dsRNA mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Strangs die EGFR-Expression nach Transfektion in U-87 MG-Zellen signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen

15 inhibieren lässt. Diese Inhibition der Expression eines endogenen Gens durch spezifische dsRNA bestätigt somit die in Ausführungsbeispiel II angeführten Ergebnisse zur Inhibition der Expression eines nach transienter Transfektion in die Zelle eingebrachten artifiziellen Gens. Die durch ES-7 bzw.

20 ES-8 vermittelte Inhibition der EGFR-Expression ist deutlich geringer. Die in Fig. 24 verwendeten dsRNAs sind Tabelle 3 zu entnehmen.

25 VI. Hemmung der Expression des Multidrug resistance Gens 1 (MDR1) :

Versuchsprotokoll:

Der *in vitro* Nachweis für das Blockieren der MDR1-Expression

30 wurde in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T (ATCC - *American Type Culture Collection*; Tom et al., 1976) durchgeführt. Von

dieser Zelllinie ist bekannt, daß die Expression von MDR1 durch Zugabe von Rifampicin zum Kulturmedium induzierbar ist (Geick et al., 2001). Transfektionen wurden mit verschiedenen käuflichen Transfektions-Kits (Lipofectamine, Oligofectamine, beide Invitrogen; TransMessenger, Qiagen) durchgeführt, wobei der TransMessenger Transfektions-Kit sich als für diese Zelllinie am geeignetsten herausstellte.

Zur Durchführung der RNA-Interferenz-Experimente wurden 4 kurze doppelsträngige Ribonukleinsäuren R1-R4 eingesetzt, deren Sequenzen in Tabelle 4) gezeigt sind. Die Ribonukleinsäuren sind mit Abschnitten der kodierenden Sequenz von MDR1 (Sequenzprotokoll SQ 30) homolog. Die Sequenzen R1 - R3 bestehen aus einem 22-mer Sinn- und einem 24-mer Antisinn-Strang, wobei der entstehende Doppelstrang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2-Nukleotid-Überhang aufweist (0-22-2). Die Sequenz R4 entspricht R1, jedoch besteht sie aus einem 19-mer Doppelstrang mit je 2-Nukleotid-Überhängen an jedem 3'-Ende (2-19-2).

<u>Name</u>	<u>Sequenz- proto- koll-Nr.</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Position in Daten- bank-# AF016535</u>
Seq R1	SQ141 SQ142	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG A-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA UUC U-5'	1320-1342 1335-1318
Seq R2	SQ143 SQ152	5' - UAU AGG UUC CAG GCU UGC UGU A-3' 3' -CG AUA UCC AAG GUC CGA ACG ACA U-5'	2599-2621 2621-2597
Seq R3	SQ144 SQ145	5' - CCA GAG AAG GCC GCA CCU GCA U-3' 3' -UC GGU CUC UUC CGG CGU GGA CGU A-5'	3778-3799 3799-3776
Seq R4	SQ146 SQ147	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA U -5'	1320-1341 1339-1318

			<b><u>Position in</u></b> <b><u>Daten-</u></b> <b><u>bank-#</u></b> <b><u>AF402779</u></b>
K1A/	SQ153	5' - ACA GGA UGA GGA UCG UUU CGC A-3'	2829-2808
K2B	SQ158	3' -UC UGU CCU ACU CCU AGC AAA GCG U-5'	2808-2831

**Tabelle 4**

Die in Tabelle 4 gezeigten Sequenzen sind nochmals im Sequenzprotokoll als Sequenzen SQ141-147, 152, 153, 158 wiedergegeben. Die dsRNAs wurden in einer Konzentration von 175 nM jeweils als doppelte Ansätze in die Zellen transfiziert, welche am Tag zuvor in 12-Loch-Platten à 3,8 x 10<sup>5</sup> Zellen/Vertiefung ausgesät wurden. Dazu wurden pro Transfektionsansatz 93,3 µl EC-R-Puffer (TransMessenger Kit, Qiagen, Hilden) mit 3,2 µl Enhancer-R vermennt und danach 3,5 µl der jeweiligen 20 µM dsRNA zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 6 µl TransMessenger Transfection Reagent wurden die Transfektionsansätze 10 Sekunden kräftig gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und 200 µl frisches Medium ohne FCS pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der 10-minütigen Inkubationszeit wurden je 100 µl FCS-freies Medium zu den Transfektionsansätzen pipettiert, gemischt, und die Mischung tropfenweise zu den Zellen pipettiert (die dsRNA-Konzentration von 175 µM bezieht sich auf 400 µl Medium Gesamtvolumen). Die dsRNA/Trans-Messenger-Komplexe wurden 4 Stunden bei 37°C mit den Zellen in FCS-freiem Medium inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das frische Medium 10 µM Rifampicin und 10% FCS enthielt. Als

Kontrolle wurde eine unspezifische dsRNA-Sequenz, die keinerlei Homologie mit der MDR1-Gensequenz aufweist, eingesetzt (K) und eine MOCK-Transfektion durchgeführt, die alle Reagenzien außer dsRNA enthielt.

5

Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen extrahiert. 10  $\mu$ g Gesamt-RNA jeder Probe wurden auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit 5'- $\alpha^{32}$ P-dCTP random-markierten, spezifischen Sonden zuerst gegen MDR1 und nach dem Strippen des Blots gegen GAPDH als interne Kontrolle hybridisiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

15 Die Röntgenfilme wurden digitalisiert (Image Master, VDS Pharmacia) und mit der Image-Quant-Software quantifiziert. Dabei wurde ein Abgleich der MDR1-spezifischen Banden mit den entsprechenden GAPDH-Banden durchgeführt.

20 Ergebnisse:

Die Fig. 25 und 26 zeigen Northern-Blots (Fig. 25a, 26a) mit quantitativer Auswertung der MDR1-spezifischen Banden nach Abgleich mit den entsprechenden GAPDH-Werten (Fig. 25b, 26b). Es konnte eine Reduktion der MDR1-mRNA um bis zu 55 % im Vergleich zur MOCK-Transfektion und um bis zu 45 % im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-Transfektion beobachtet werden. Nach 48 h ist eine signifikante Reduktion des MDR1-mRNA-Niveaus mit den als R1, R2, R3 (Tabelle 4) bezeichneten dsRNA-Konstrukten erreicht worden. Mit den R4-dsRNA-Konstrukten wurde nach 48 h keine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollen beobachtet (Fig. 26a und 26b). Nach 74 h war eine deutlich stärkere Reduktion des MDR1-mRNA-Levels mit R1, R2 und R3 gegenüber den Kontrollen im Vergleich zu den 48 h-Werten zu beobachten (Fig. 25a und 25b).

Mit R4 konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine signifikante Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus erzielt werden. Somit reduzieren die Konstrukte mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinnstrangs und einem doppelsträngigen Bereich aus 22 Nukleotidpaaren, relativ unabhängig von dem jeweiligen zum MDR1-Gen homologen Sequenzbereich (nach 48 h; Fig. 26b) das MDR1-mRNA-Level effizienter als die Konstrukte mit mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge (Antisinn- und Sinnstrang) und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren. Die Ergebnisse bekräftigen damit die in Ausführungsbeispiel IV beschriebene Inhibition der EGFR-Genexpression durch spezifische dsRNAs nach Transfektion in U-87 MG-Zellen.

Die Transfektionseffizienz wurde in einem getrennten Experiment mit Hilfe eines Texas-Red-markierten DNA-Oligonukleotids (TexRed-A(GATC)<sub>5</sub>T; ebenfalls 175 nM transfiziert) ermittelt (Fig. 27a, 27b; 400fache Vergrößerung, 48h nach Transfektion). Sie betrug etwa 50% auf der Grundlage der rot fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Berücksichtigt man die Transfektionsrate der Zellen von etwa 50%, so legt die beobachtete Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus um ca. 45-55% liegt (verglichen mit den Kontrollen), den Schluss nahe, dass in allen Zellen, die mit spezifischer dsRNA erfolgreich transfiziert werden konnten, die MDR1-mRNA nahezu vollständig und spezifisch abgebaut wurde.

Literatur:

Alroy I & Yarden Y (1997): The Erb signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letters 410: 83-86.

Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.

Bosher, J.M. and Labouesse, M., 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nature Cell Biology 2, E31-E36.

Bradford MM (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R.A., 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 252, 95-105.

Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maelhama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6499-6503.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G & Slamon DJ (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that



has progressed after chemotherapy for metastatic disease.  
Journal of Clinical Oncology 17: 2639-2648.

Ding, S.W., 2000. RNA silencing. Curr. Opin. Biotechnol. 11,  
5 152-156.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E.,  
and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interfer-  
ence by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature  
10 391, 806-811.

Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet.  
15, 358-363.

15 Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruth-  
ers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H., 1986. Improved free-  
energy parameters for prediction of RNA duplex stability.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377 .

20 Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001). Nuclear receptor  
response elements mediate induction of intestinal MDR1 by ri-  
fampin. J. Biol. Chem. 276 (18), 14581-14587.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M,  
25 Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR,  
Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G & Ciardiello F (1998):  
Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors  
and receptors and of neoangiogenesis in completely resected  
stage I-IIIA non-small-cell lung cancer: amphiregulin and mi-  
30 crovessel count are independent prognostic factors of sur-  
vival. Clinical Cancer Research 4: 241-249.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.

- 5 Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell*, 82, 693-696.

Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1993): Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76: 79-90.

10

Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1998): Non-invasive sexing of preimplantation mammalian embryos. *Nature Genetics* 19: 220-222.

15

Kyhse-Anderson J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-210.

20

Lämmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 25 Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.

Huang SM & Harari PM (1999): Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Investigational New Drugs* 17: 259-269.

30

Limmer, S., Hofmann, H.-P., Ott, G., and Sprinzl, M., 1993. The 3'-terminal end (NCCA) of tRNA determines the structure and

stability of the aminoacyl acceptor stem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 , 6199-6202.

Montgomery, M.K. and Fire, A., 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. Trends Genet. 14, 255-258.

Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A., 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502-15507.

Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Bienhat W & Liberski PP (1998): A comparative study of epidermal growth factor (EGFR) and mdm2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. Polish Journal of Pathology 49: 145-149.

Robert, J. (1999). Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. Europ J Clin Invest 29, 536-545.

Stavrovskaya, A.A. (2000) Biochemistry (Moscow) 65 (1), 95-106.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F & Normanno N (1995): Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies: Critical Reviews in Oncology and Haematology 19: 183-232.

Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), In vitro, 12, 180-191.

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981).  
Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo  
and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and  
vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41, 1967-72.

5

Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K., 2000. Sensitive  
assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster  
cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS  
Lett.* 479, 79-82.

10

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW,  
Lee J, Yarden Y, Liebermann TA, Schlessinger J et al. (1984):  
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequences and ab-  
errant expression of the amplified gene in A431 epidermoid  
carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.

15

Ullrich A & Schlessinger J (1990): Signal transduction by re-  
ceptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.

20

Van der Geer P, Hunter T & Linberg RA (1994): Receptor pro-  
tein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways.  
Annual review in Cell Biology 10: 251-337.

25

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thopmsen M & Poulsen HS  
(1997): Epidermal growth factor Receptor (EGFR) and EGFR mu-  
tations, function and possible role in clinical trials. *Annu-  
als of Oncology* 8: 1197-1206.

30

Walker RA & Dearing SJ (1999): Expression of epidermal growth  
factor receptor mRNA and protein in primary breast carcino-  
mas. *Breast Cancer Research Treatment* 53: 167-176.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P., 2000.  
RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage  
of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33.

- 5 Zor T & Selinger Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal. Biochem. 236: 302-308.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

5

Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

15

und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vor-  
hergehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige  
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,  
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des  
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten  
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang  
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)  
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des  
10 Zielgens ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als  
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-  
15 tidpaaren aufweist/en.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise  
überlappen oder aneinander grenzen.  
20

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-  
standet sind.

25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,  
30 Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese  
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von  
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-  
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-

ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 das Zielgen das MDR1-Gens ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus  
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-  
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen  
SQ141 - 173 verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt  
15 wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmo-  
dien, exprimiert wird.

20

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-  
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid  
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-  
iert sind.



20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.  
10

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-  
15 Gruppen gebildet wird.

30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.  
20

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

25 32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.  
30

33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

5 35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

10 36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

15 37. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

20 38. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

25 39. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

30 40. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

41. Verwendung einer die doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

10

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

15 43. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

20

45. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

25 46. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

30

47. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

49. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

50. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

51. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gens ist.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

5 55. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.

56. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das  
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

57. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

15 58. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

59. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert  
20 sind.

60. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.  
25

61. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische  
30 Verknüpfung erhöht wird.

62. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

63. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die  
5 chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

64. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die  
chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbin-  
10 dungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

65. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die  
15 chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

66. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die  
chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

20

67. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die  
chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

68. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur  
25 Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

69. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die  
30 chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.

70. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.

5 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

10 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.

15 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

20 74. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

25 75. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

76. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

30

77. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.



78. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

79. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 80. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 81. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des  
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30

82. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

83. Medikament nach Anspruch 81 oder 82, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

84. Medikament nach Anspruch 83, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

85. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

10

86. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 85, enthaltend zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 81 bis 85 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II), wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

20

87. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

25

88. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 87, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

89. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 88, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

90. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinase sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

91. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

92. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

93. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

94. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

95. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

96. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

97. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

98. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

5 99. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

10 100. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.

15 101. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet  
20 ist.

102. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

25

103. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder  
30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.

104. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

105. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet ist.

5 106. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.

10 107. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

15 108. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.

20 109. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.

25 110. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.

30 111. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

112. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

113. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei  
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

114. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei  
10 bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

115. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei  
15 der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

116. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei  
20 die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

117. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-  
standet sind.

25 118. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei  
die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

119. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei  
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

120. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei  
die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar ist.

121. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

5

Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

15

und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

20 122. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

25 123. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

124. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

30 125. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

126. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vor-  
hergehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige  
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,  
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des  
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten  
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang  
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)  
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des  
10 Zielgens ist.

127. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als  
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-  
15 tidpaaren aufweist/en.

128. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise  
überlappen oder aneinander grenzen.  
20

129. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-  
standet sind.

25 130. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

131. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,  
30 Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese  
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von  
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-  
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-



ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

132. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 das Zielgen das MDR1-Gens ist.

133. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus  
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-  
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen  
SQ141 - 173 verwendet wird.

134. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt  
15 wird.

135. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmo-  
dien, exprimiert wird.

20

136. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

137. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-  
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

138. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid  
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 139. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-  
iert sind.

140. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

141. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

142. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

143. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

144. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

145. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

146. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

147. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

5 148. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.  
10

149. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-  
15 Gruppen gebildet wird.

150. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.  
20

151. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

25 152. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.  
30

153. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

154. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

5 155. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

10 156. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

15 157. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

158. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm  
20 Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

159. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen  
25 ist.

160. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verab-  
30 reicht wird.

161. Verwendung einer die doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

162. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

163. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

164. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

165. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

166. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

167. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

168. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

169. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

170. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

171. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

172. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gens ist.

173. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

174. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

5 175. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.

176. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das  
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

177. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

15 178. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

179. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert  
20 sind.

180. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.  
25

181. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische  
30 Verknüpfung erhöht wird.

182. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

183. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die  
5 chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

184. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die  
10 chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

185. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die  
15 chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

186. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die  
20 chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

187. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die  
chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

188. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur  
25 Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

189. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die  
30 chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.



190. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.

5 191. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

10 192. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.

15 193. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

20 194. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

25 195. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

30 196. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

197. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

198. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

199. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 200. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 201. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des  
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30.

202. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

203. Medikament nach Anspruch 81 oder 82, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

204. Medikament nach Anspruch 83, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

205. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

10

206. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 85, enthaltend zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 81 bis 85 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II), wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

20

207. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

25

208. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 87, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

209. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 88, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

30

210. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

211. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

212. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

213. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

214. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

215. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

216. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

217. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

218. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

5 219. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

10 220. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.

15 221. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet  
20 ist.

222. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

25

223. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder  
30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.

224. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

225. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet ist.

5 226. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.

10 227. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

15 228. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.

20 229. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.

25 230. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.

30 231. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

232. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

233. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei  
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

234. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei  
10 bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

235. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei  
15 der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

236. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei  
20 die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

237. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei  
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-  
standet sind.

238. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei  
25 die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

239. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei  
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

240. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei  
die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intrave-

nös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar ist.



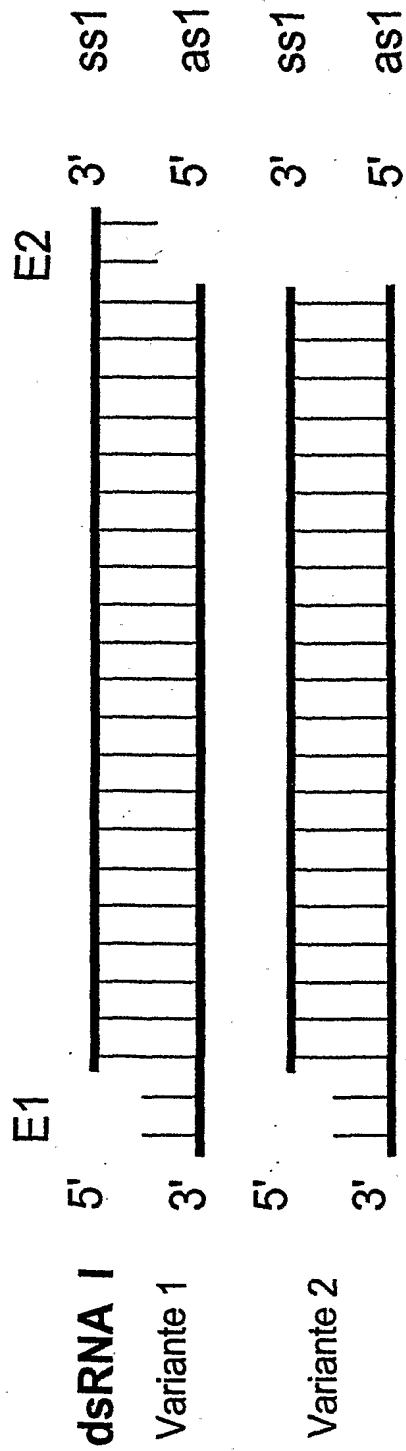


Fig. 1a

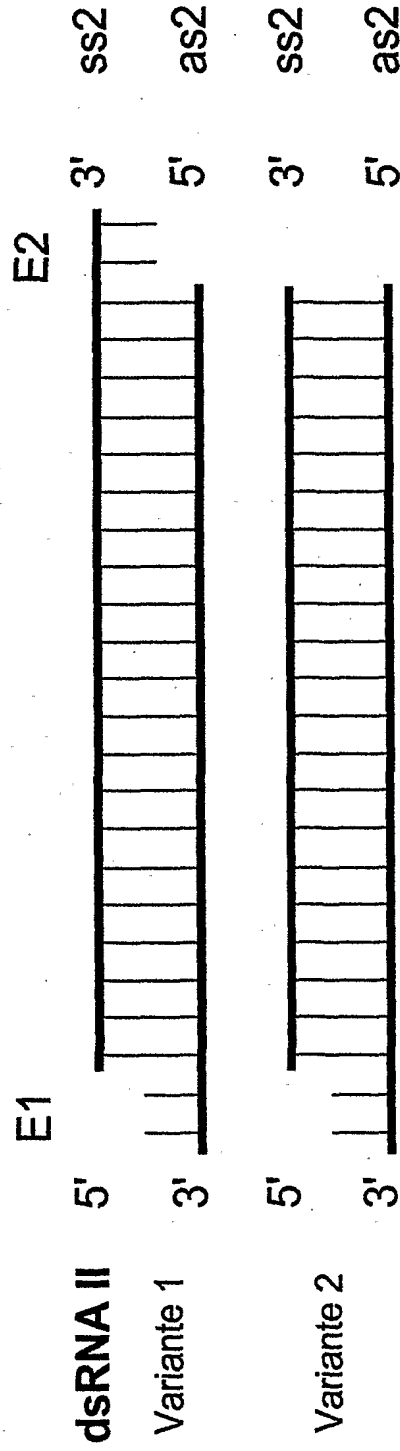


Fig. 1b

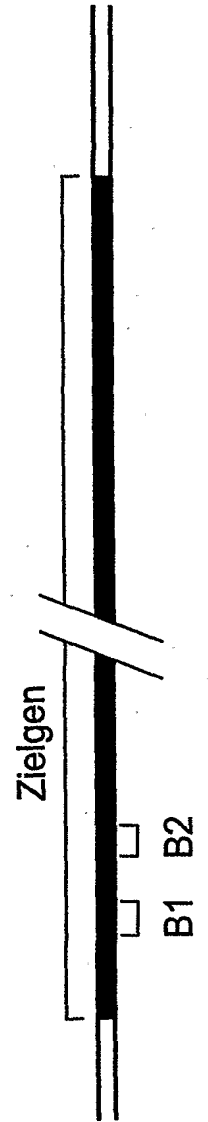


Fig. 2

2/20

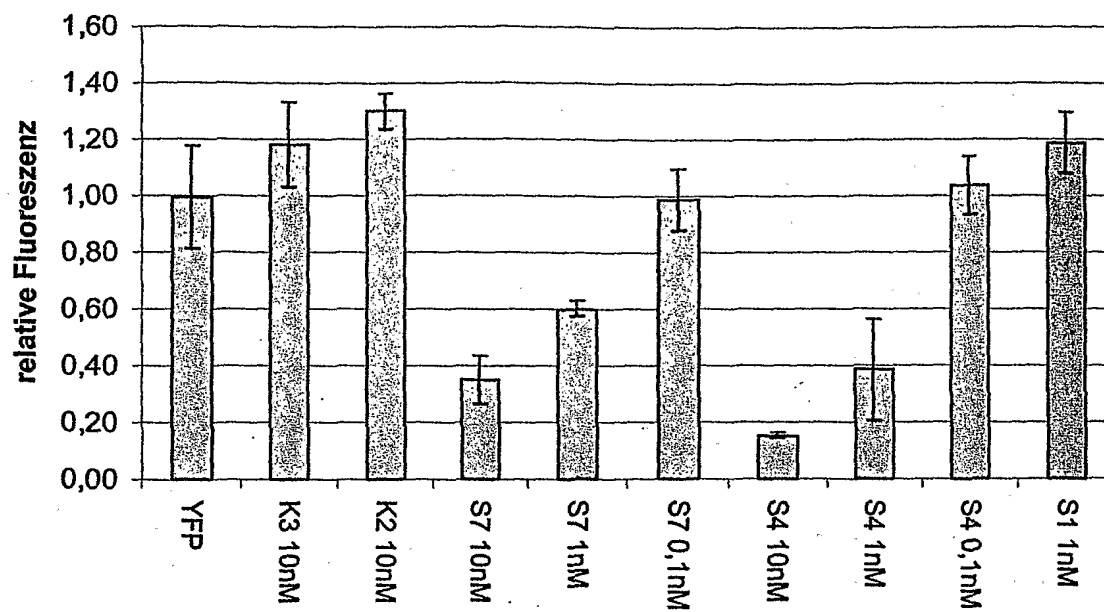


Fig. 3

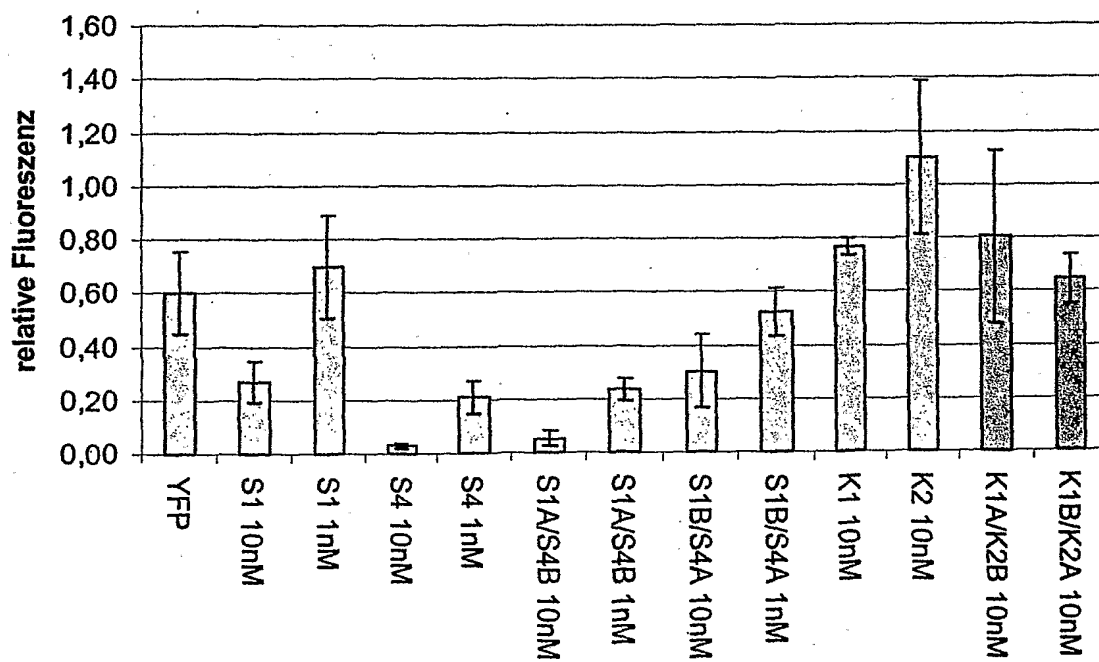


Fig. 4

3/20

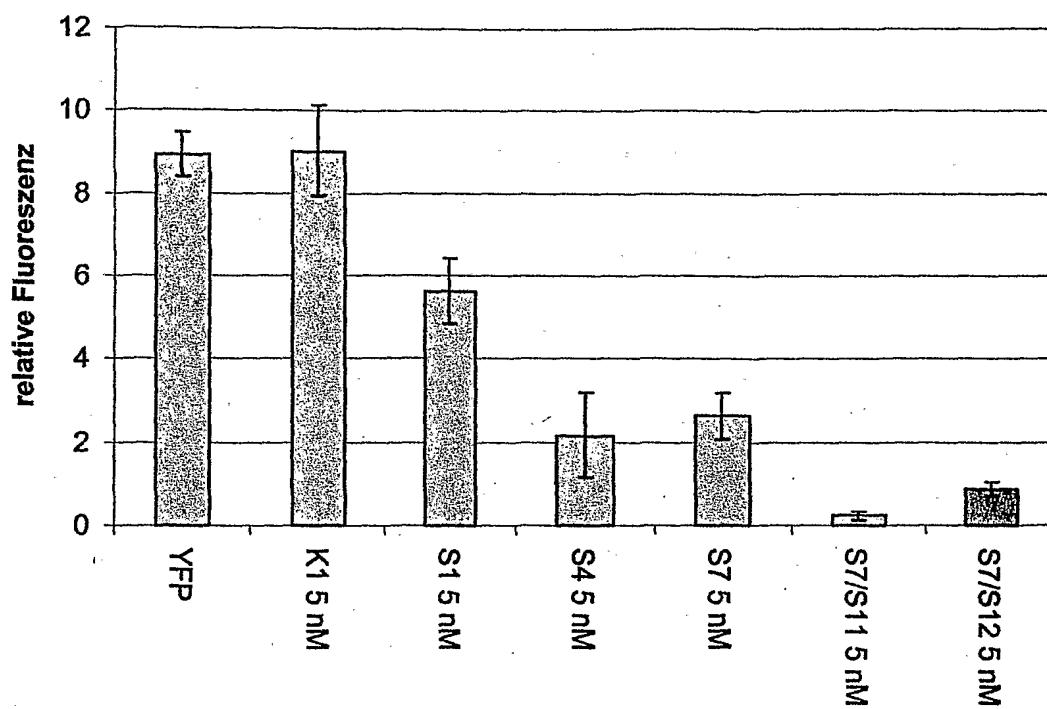


Fig. 5

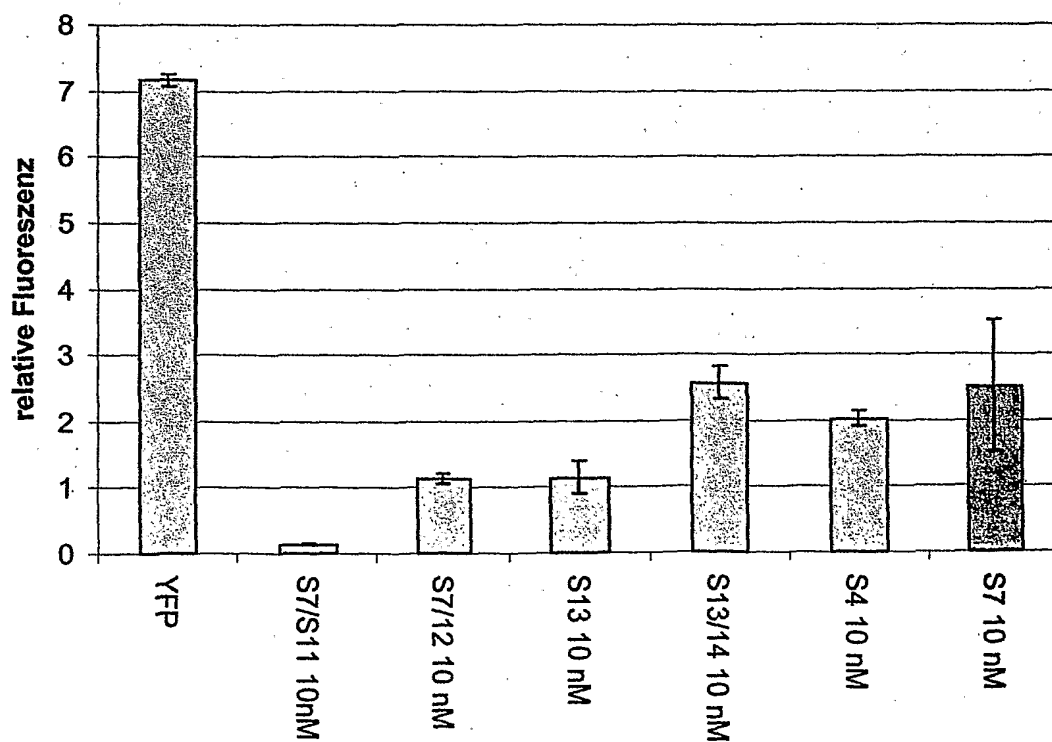


Fig. 6

4/20

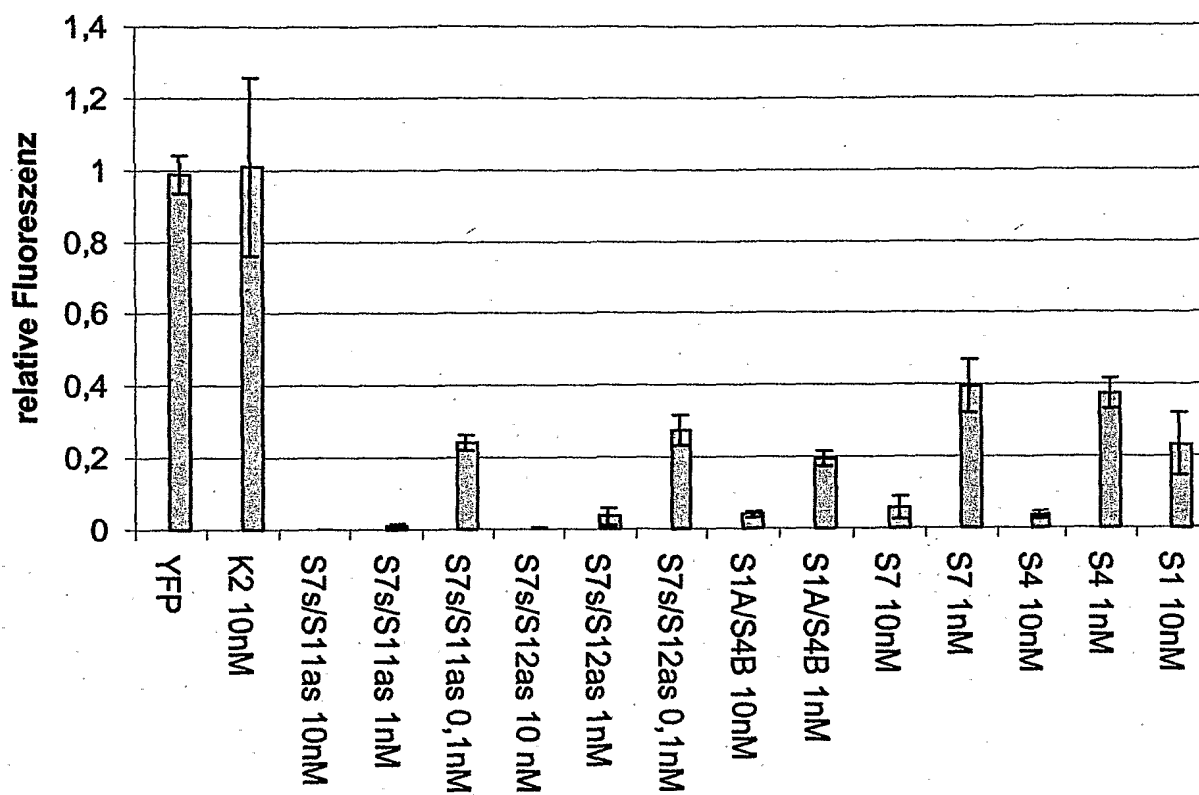
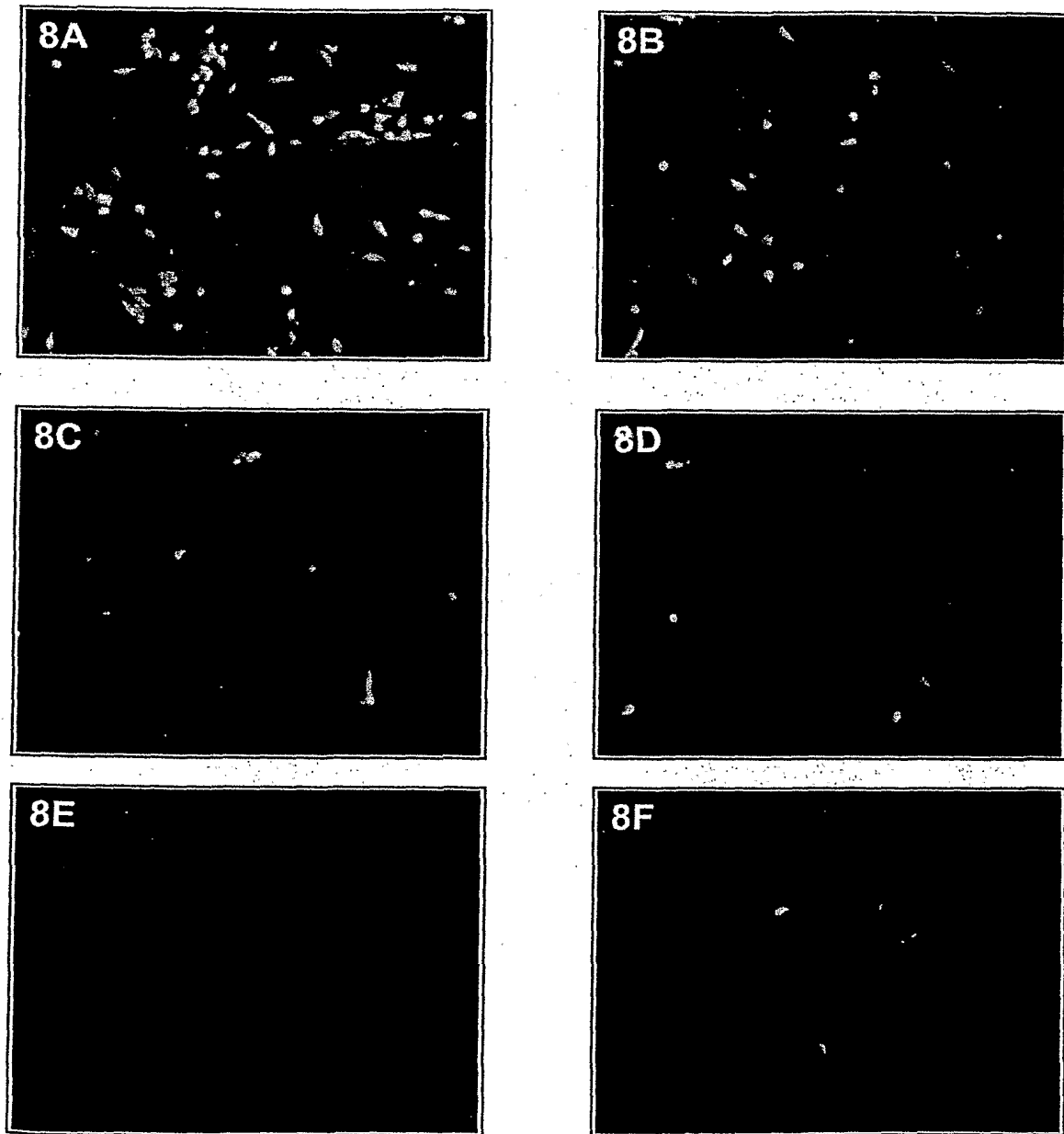


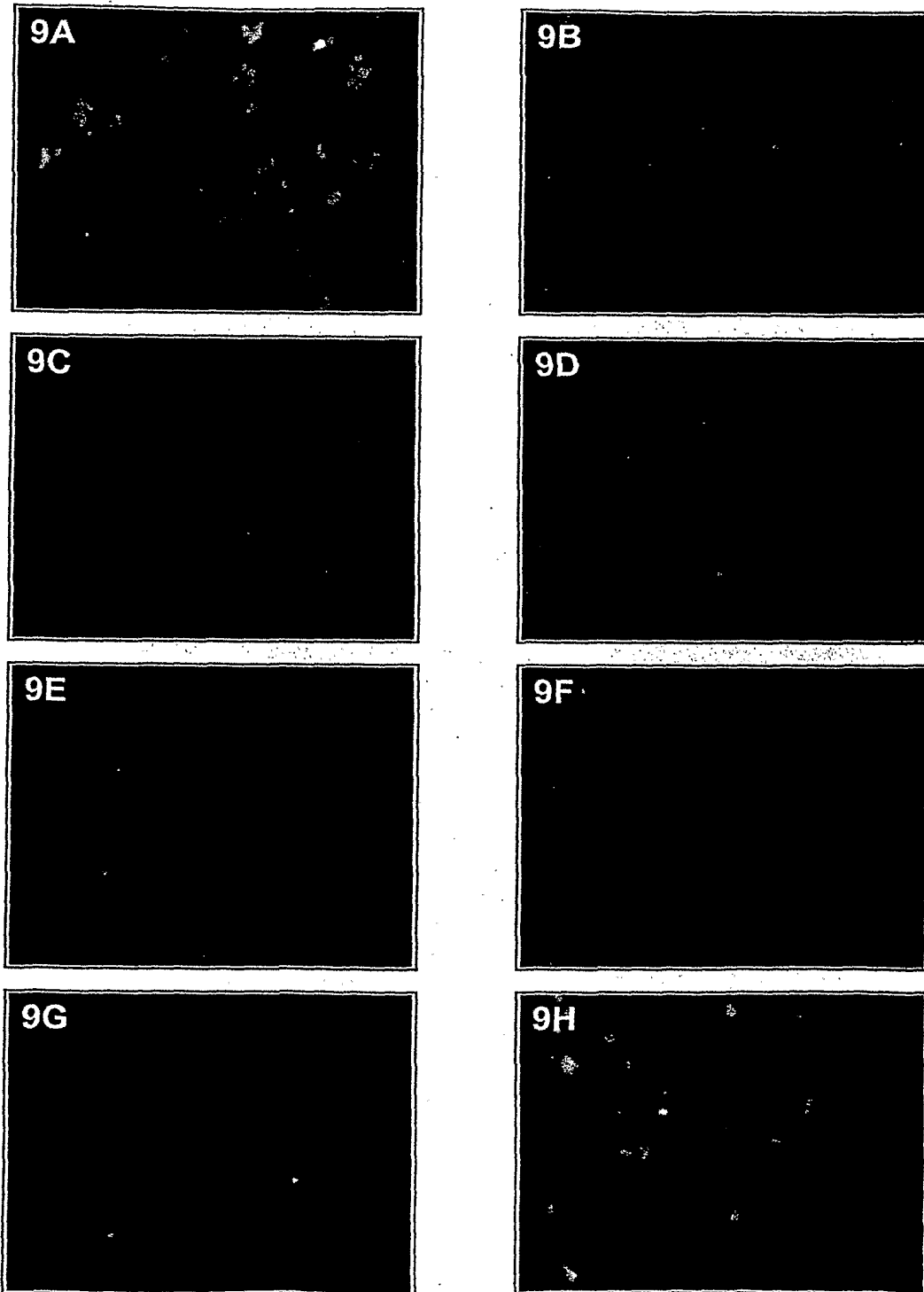
Fig. 7

5/20



**Fig. 8**

6/20



**Fig. 9**

7/20

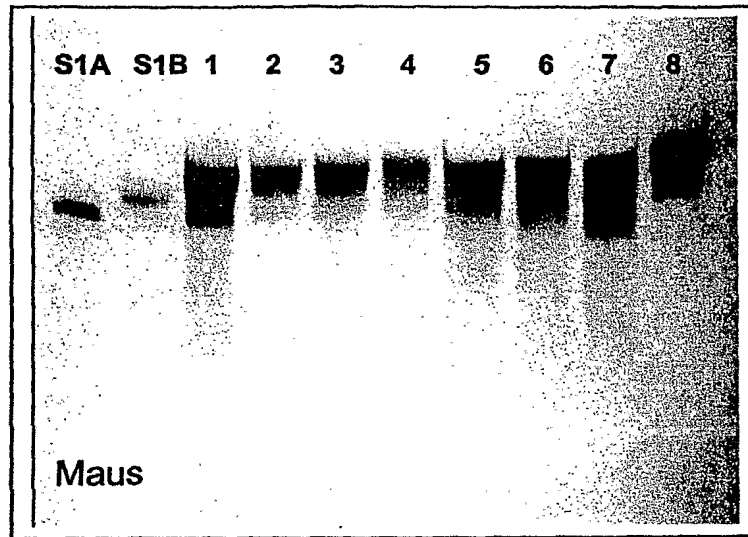


Fig. 10

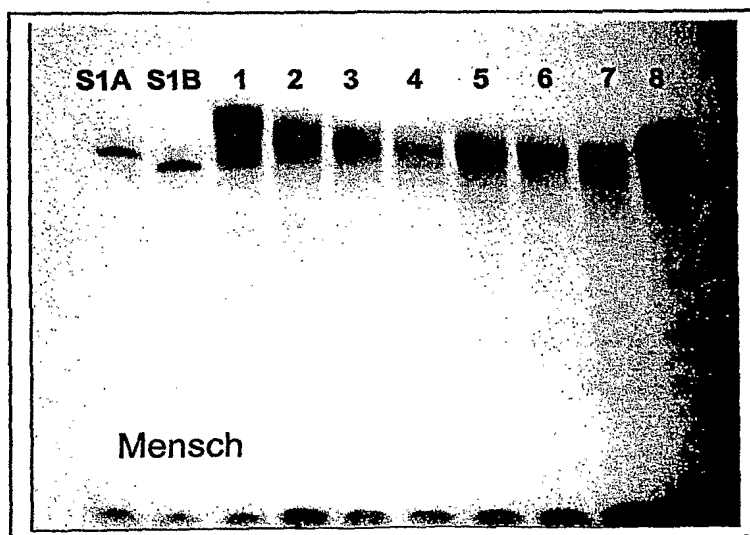


Fig. 11

8/20

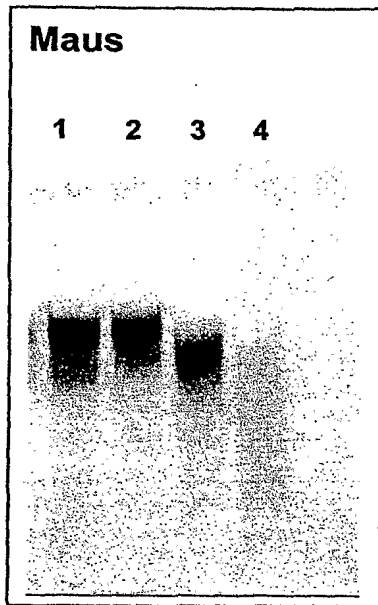


Fig. 12

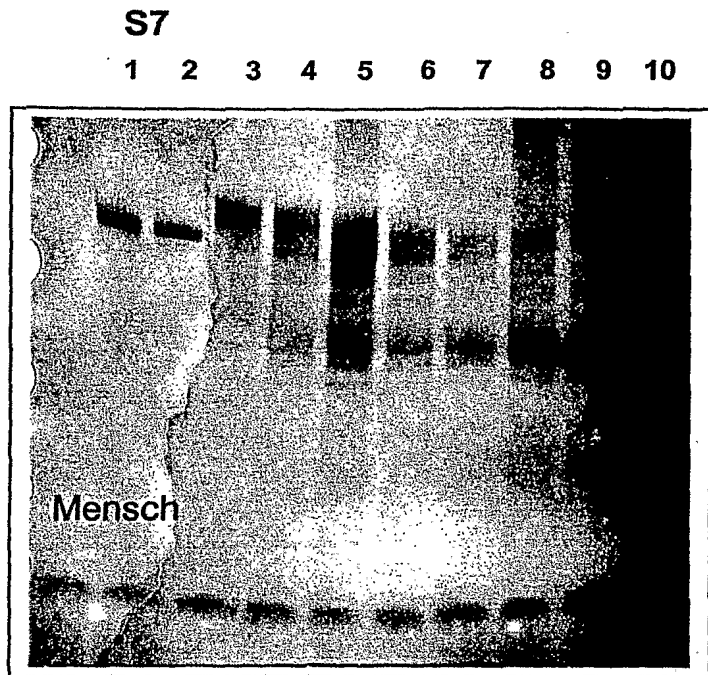


Fig. 13

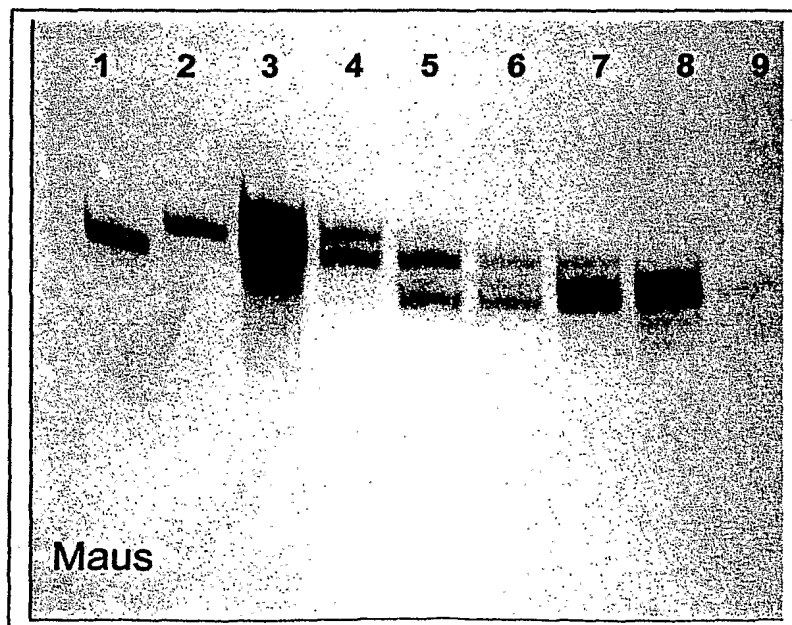


Fig. 14



9/20

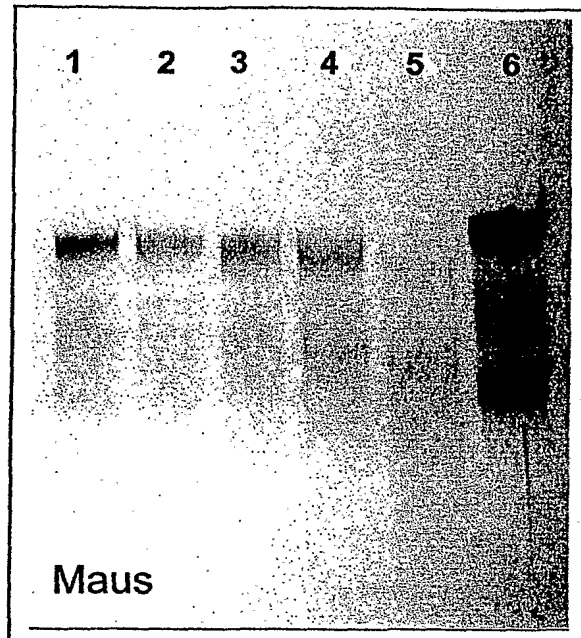


Fig. 15

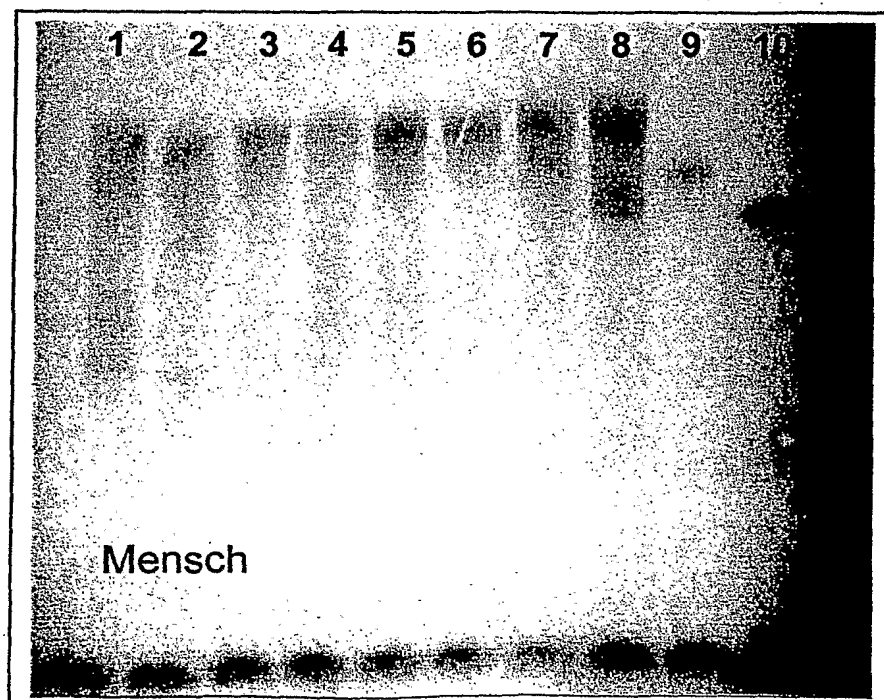


Fig. 16

10/20

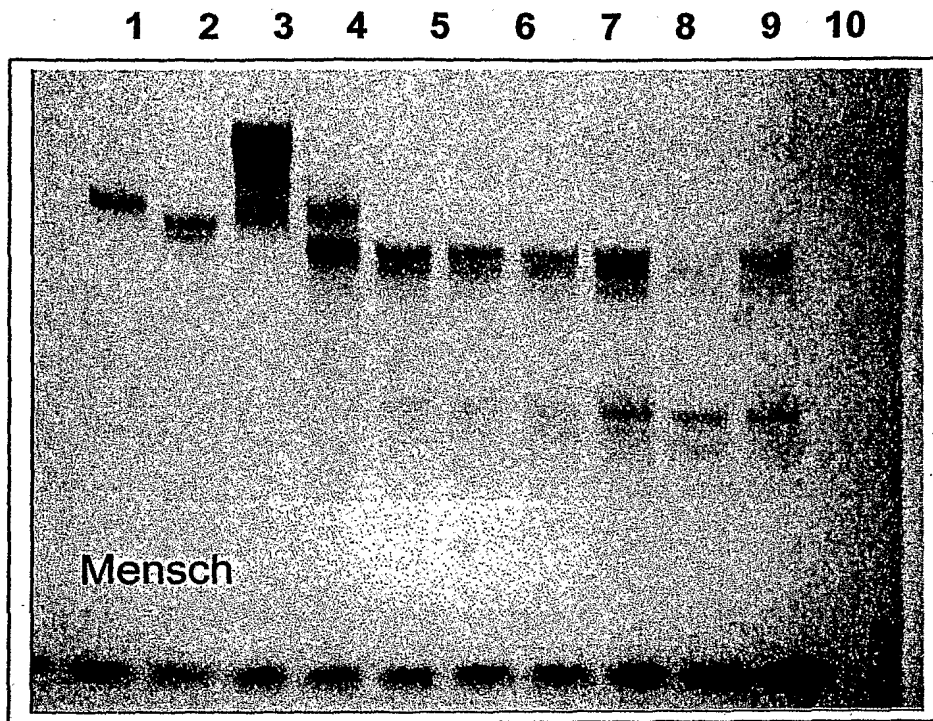


Fig. 17

11/20

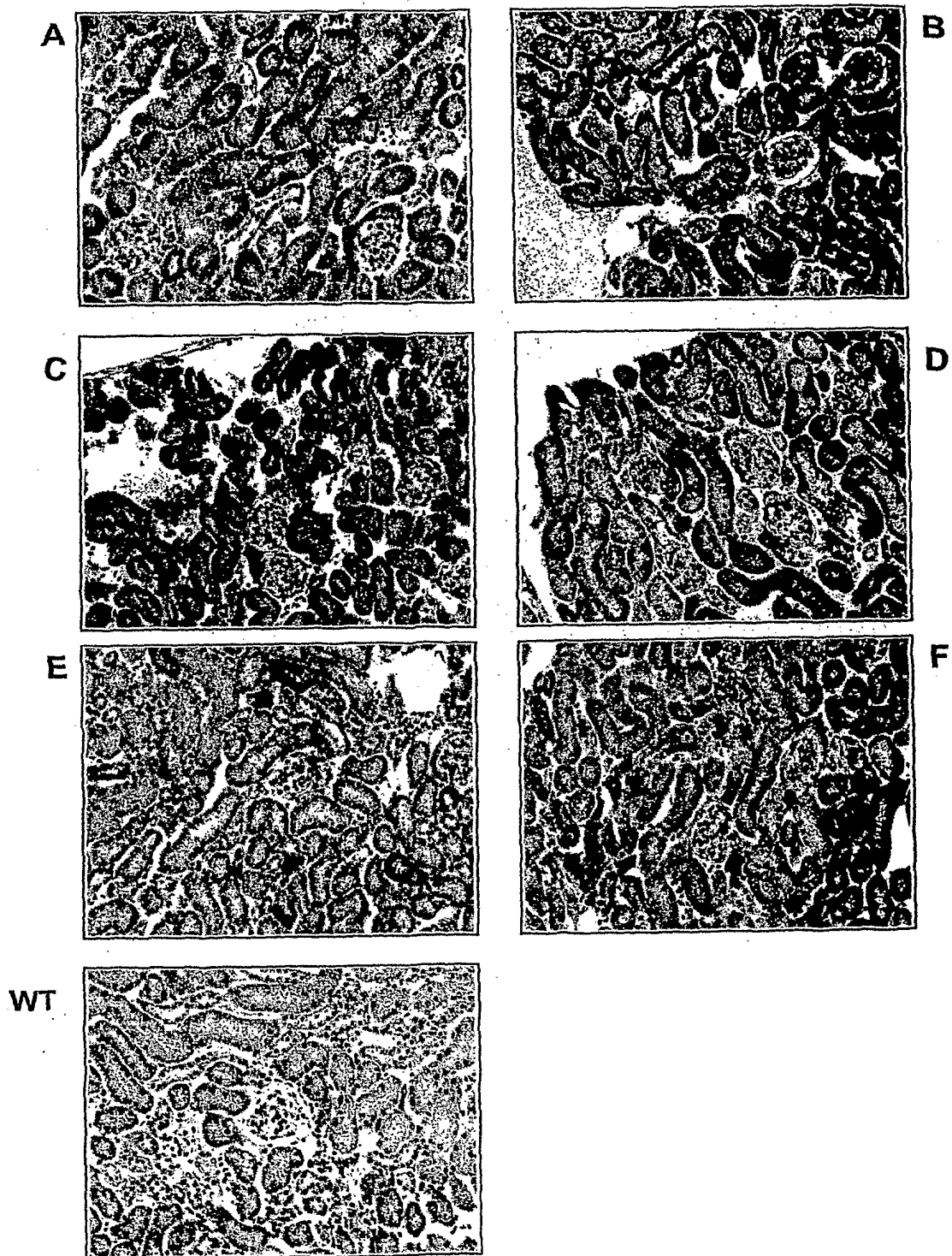


Fig. 18

12/20

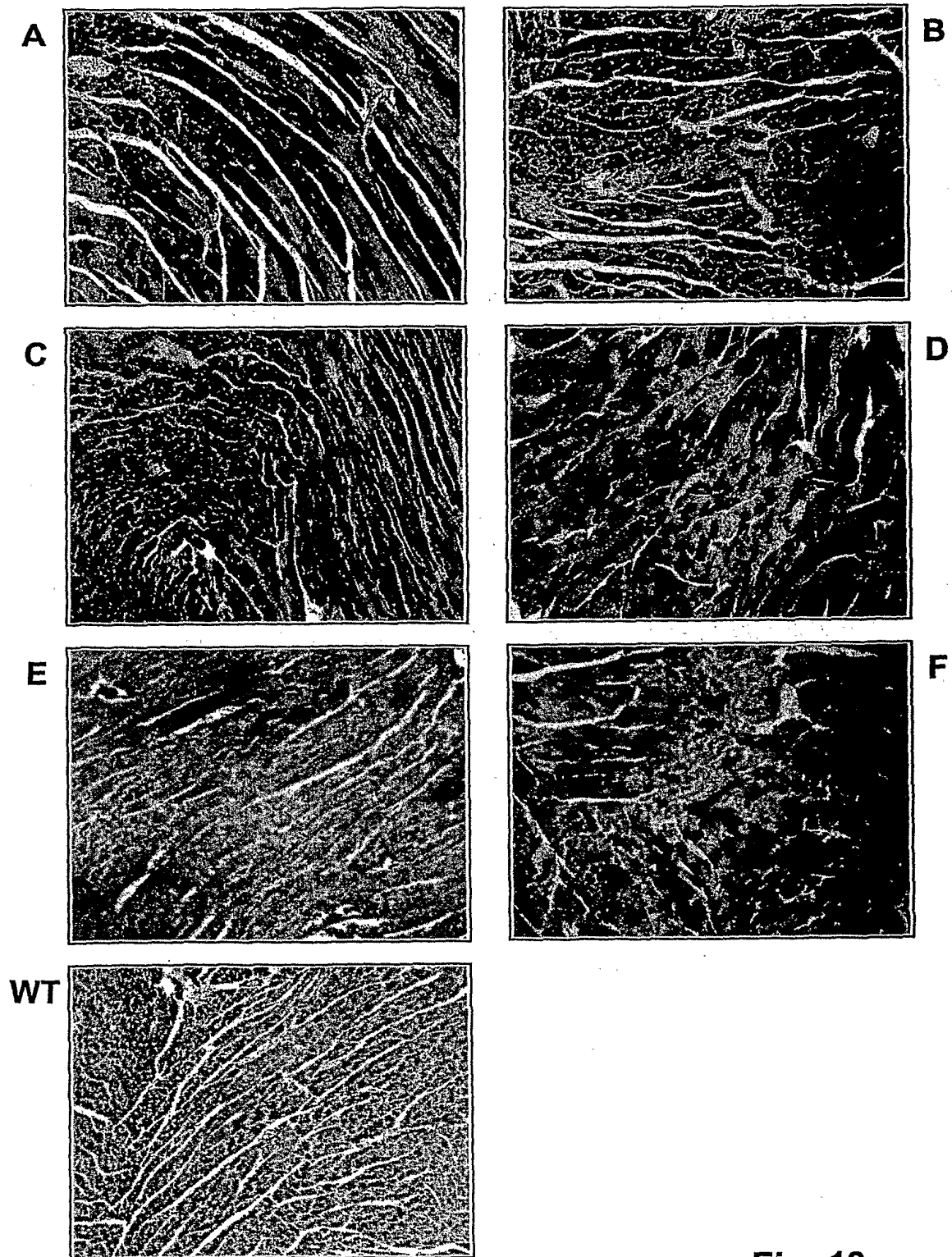


Fig. 19

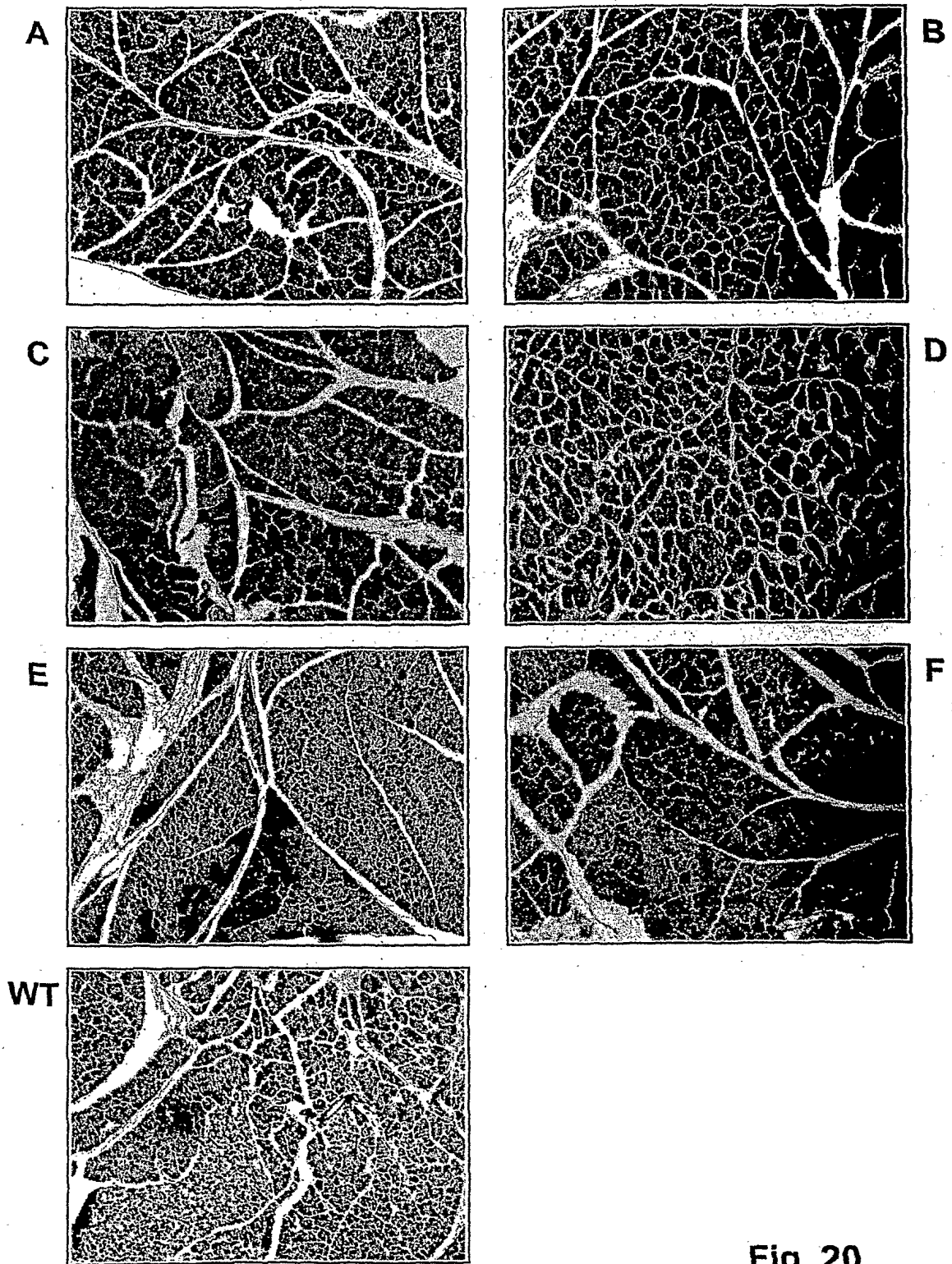
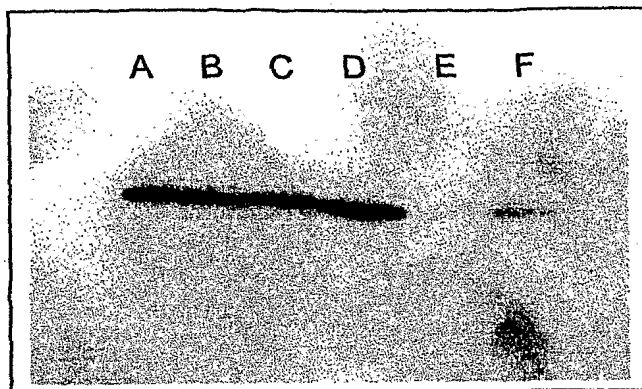
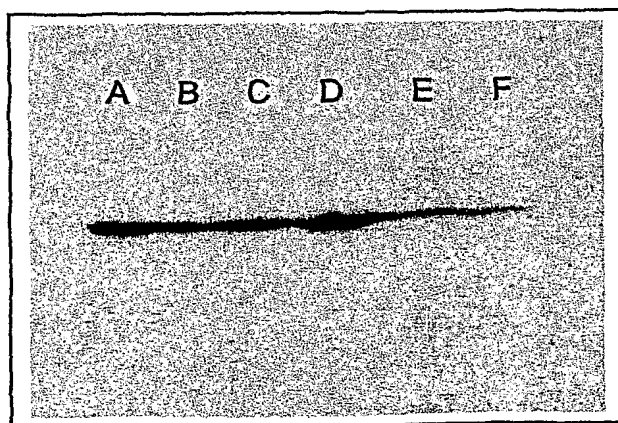


Fig. 20

14/20

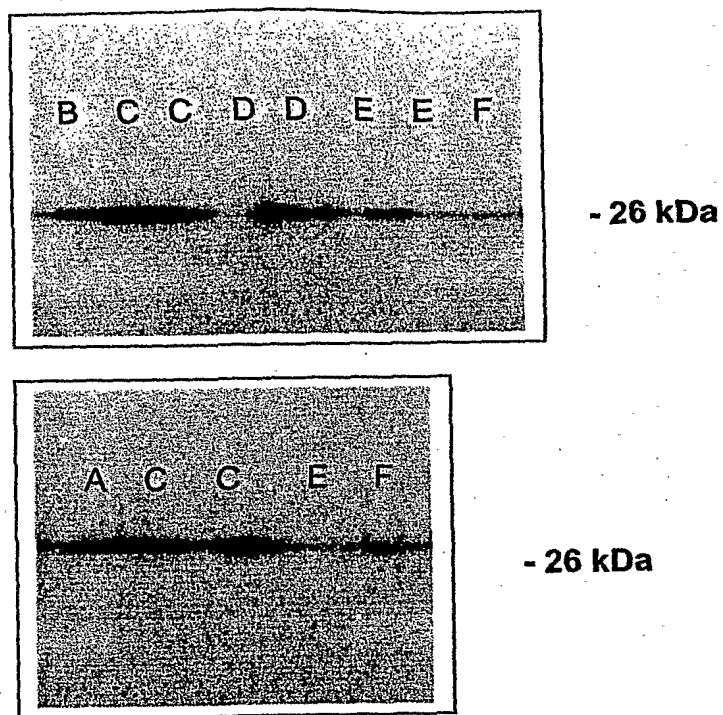


**Fig. 21**

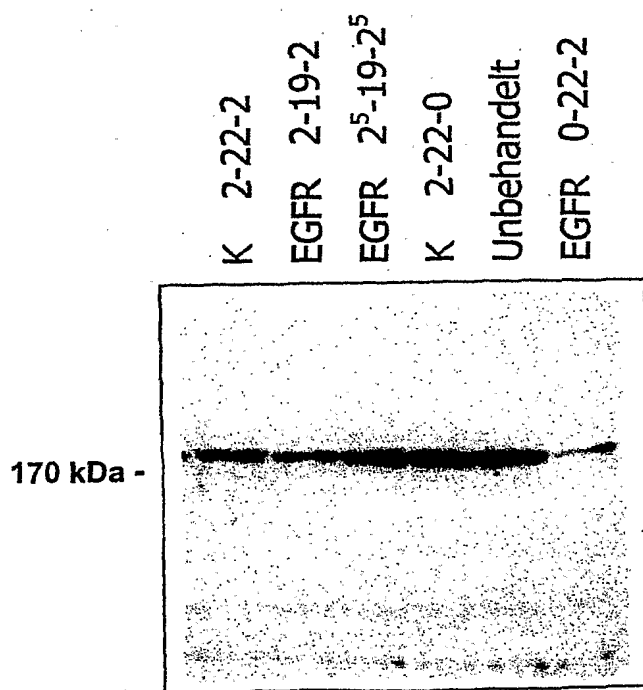


**Fig. 22**

15/20



**Fig. 23**



**Fig. 24**



16/20

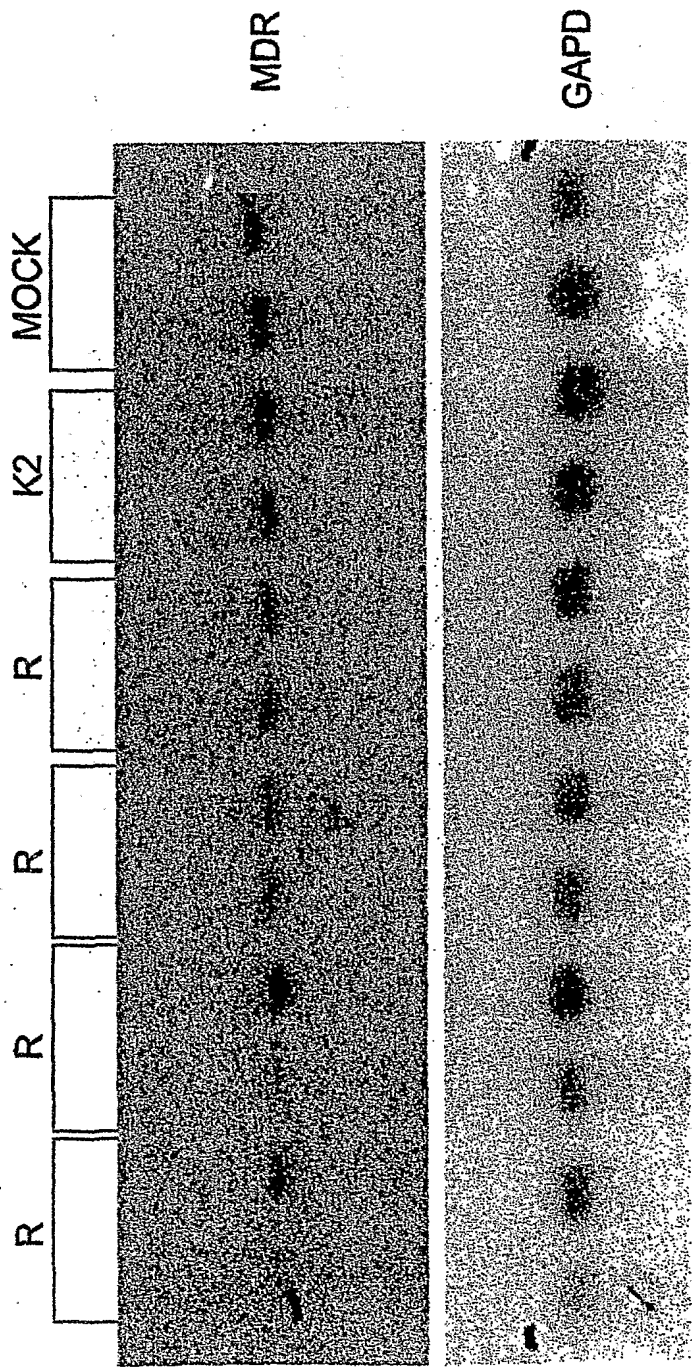


Fig. 25a



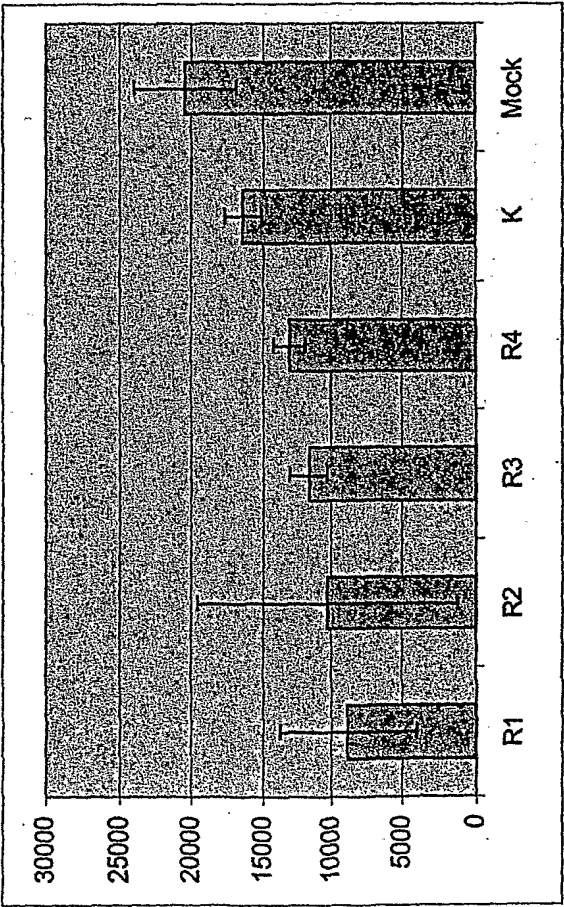


Fig. 25b

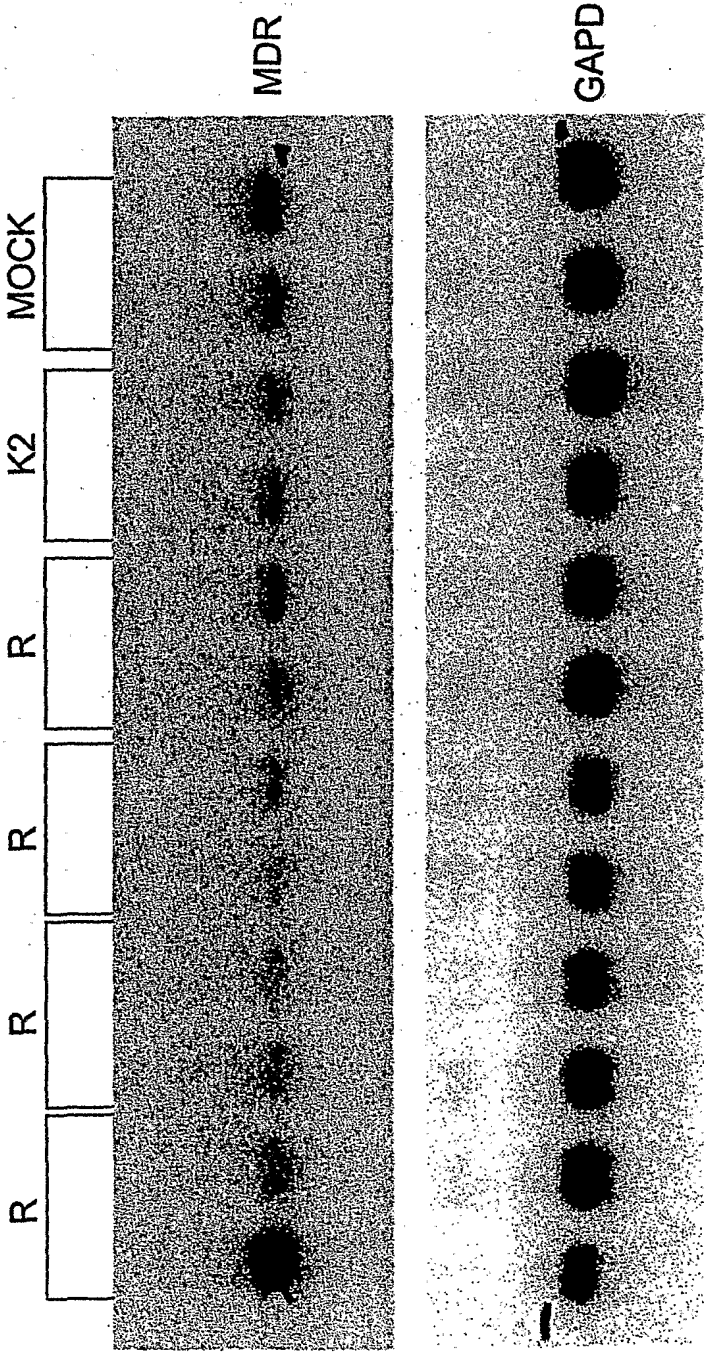


Fig. 26a

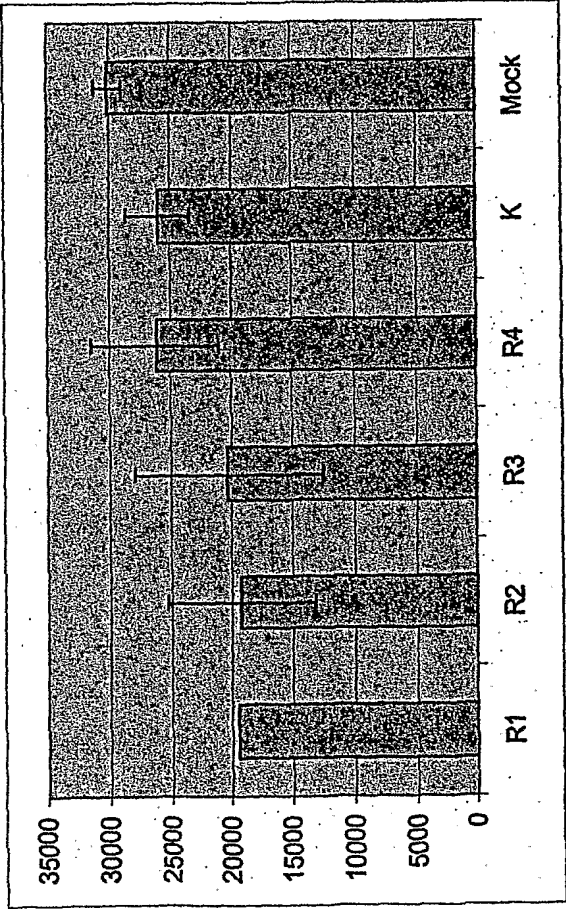


Fig. 26b

20/20

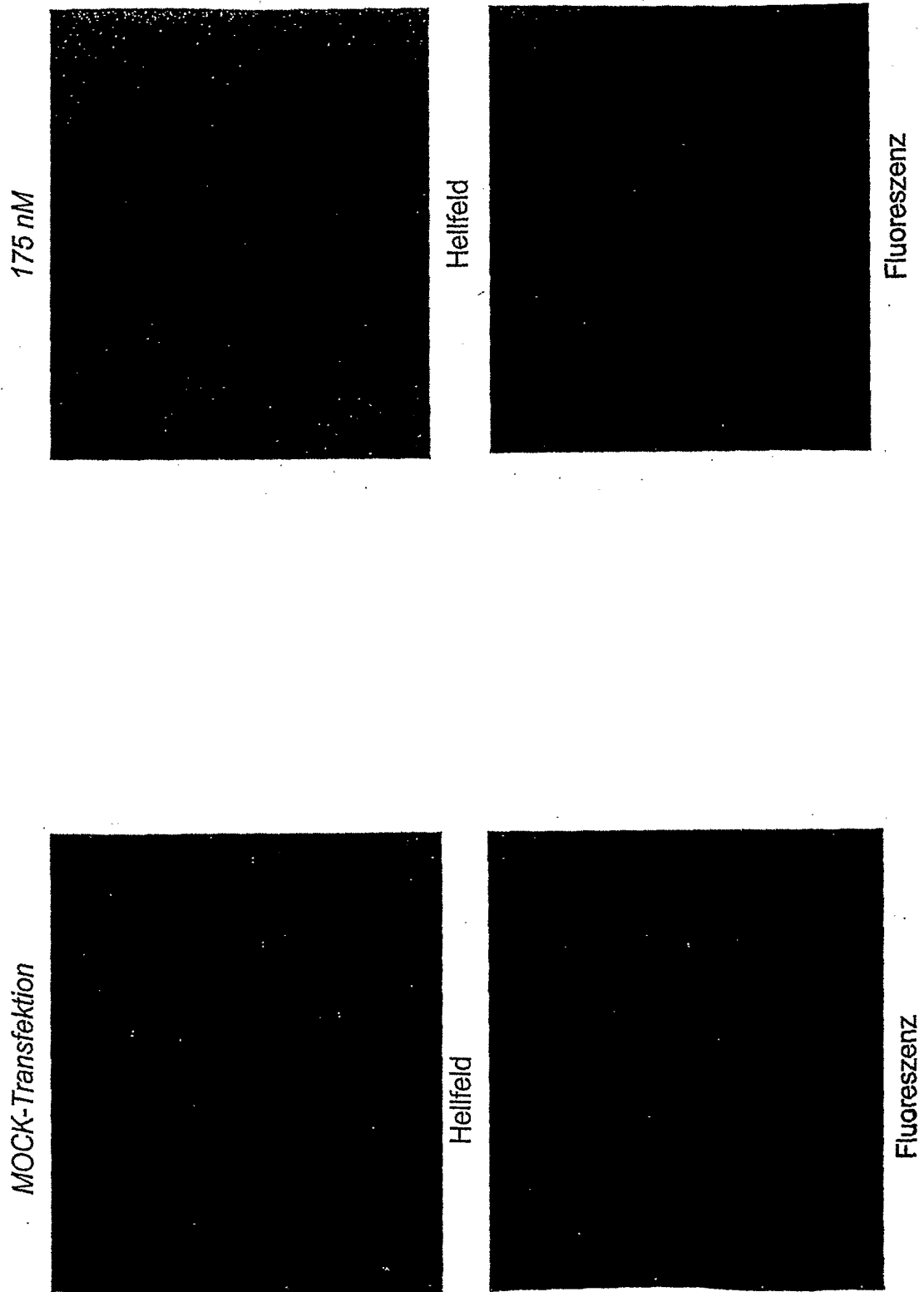


Fig. 27